

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR L'OBTENTION
DU TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Mention Pharmacie)

PAR
Jean GAILLOT

Sur quelques aspects du métabolisme du cuivre
chez le rat et en biologie humaine

Soutenue le 10 Décembre 1968 devant la Commission d'Examen

JURY : MM. les Professeurs M.L. GIRARD *Président*
J. E. COURTOIS { *Examineurs*
Y. COHEN

J.A.T.

1968

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR L'OBTENTION

DU TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Mention Pharmacie)

PAR

Jean GAILLOT

Sur quelques aspects du métabolisme du cuivre
chez le rat et en biologie humaine

Soutenue le 10 Décembre 1968 devant la Commission d'Examen

JURY : MM. les Professeurs M.L. GIRARD *Président*
J. E. COURTOIS {
Y. COHEN *Examineurs*

J.A.T.

1968



Digitized by the Internet Archive
in 2026



PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MALANGEAU P.	DOYEN
GUILLOT M.	Assesseur, O*
DELAVEAU P.	Assesseur
RODINEAU L.	Secrétaire Général, *
FERRARI (Mme S.)	Attaché Principale
JEANDEL L.	Attaché
ESPINASSE (Mme M.-L.)	Attaché
BRENN A.	Attaché, *
JACOB A.	Attaché, *
MUR (Mme A.-M.)	Attaché
FRIZOL (Mlle E.)	Attaché
TRICAN J.	Attaché

PROFESSEURS HONORAIRES

LAUNOY L.	O*
FLEURY P.	O*
PICON M.	O*

PROFESSEURS

JANOT M.-M., O*, Membre de l'Institut	Pharmacie Galénique (T)
VALETTE G., O*	Pharmacodynamie (T)
PARIS R., *	Matière Médicale (T)
GUILLOT M., O*	Physique (T)
GAUTIER J.-A., O*	Chimie Organique (T)
LAMBIN (Mlle S.), *	Microbiologie (T)
RAOUL Y., *	Physiologie (T)
COURTOIS J.-E., *	Chimie Biologique (T)
DOMANGE L., O*	Chimie Générale et Minérale (T)
TRUHAUT R., O*, Membre de l'Institut	Toxicologie (T)
MORETTE A., *	Hydrologie (T)
CAVIER R., *	Parasitologie (T)
QUEVAUVILLER A., *	Hygiène et Education Sanitaire (T)
MOREAU R., *	Pharmacie Chimique (T)
GERMAN A.	Virologie et Sérologie (T)

PIETTE M., *	Biologie Sanguine, Hématologie (T)
MALANGEAU P.	Chimie Analytique (T)
GIRARD M., *	Biochimie Appliquée (T)
DILLEMANN G.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
DEYSSON G.	Botanique (T)
MICHEL R.	Endocrinologie (T)
FLAHAUT J.	Minéralogie (T)
RENAULT J.	Chimie Organique (T)
LE HIR A.	Pharmacie Galénique (T)
BOUDENE C.	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
DELAVEREAU P.	Matière Médicale et Séméiologie (T)
LARUELLE P.	Physique (T)
ROSSIGNOL P.	Pharmacodynamie (T)
MANGEOT A.	Pharmacie Galénique Industrielle
COHEN Y.	Pharmacodynamie
RENAULT H.	Physique
BOURDON R.	Chimie Analytique
REYNAUD P.	Pharmacie Chimique
LE MOAN R.	Toxicologie
POISSON J.	Pharmacie Galénique
LECLERC M.	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

SAVEL J.	Biologie Animale
PERCHERON F.	Chimie Biologique
PAOLETTI C.	Toxicologie
DESVIGNES A.	Cryptogamie et Technique Bactériologique
BORY M.	Microbiologie
MIOCQUE M.	Chimie Organique
GUIGNARD J.-L.	Botanique Générale
GOUNELLE J.-C.	Physiologie
BINET P.	Biologie Animale
COMBET-FARNOUX C.	Chimie Organique
PLAT (Mme M.)	Législation et Déontologie Pharmaceutique
DELACOUX E.	Pharmacie Chimique
ADOLPHE C.	Physique
GUERNET M.	Chimie Analytique et Bromatologie
DIDRY J.	Mathématiques
KHODADAD P.	Chimie Minérale et Minéralogie
PERLES R. (F.F.)	Chimie Biologique
YONGER J. (F.F.)	Chimie Analytique
RIVET J. (F.F.)	Chimie Générale et Minérale
HAZEBROUCQ (F.F.)	Physique
ETIENNE J. (F.F.)	Mathématiques
MESTRE J. (F.F.)	Botanique
BOURRINET P. (F.F.)	Hygiène Education Sanitaire
SOULEAU Ch. (F.F.)	Chimie Générale et Minérale

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

AGNERAY J.	T.P. Chimie Biologique 2 ^e année
ASTIN C. (F.F.)	T.P. Physique 1 ^{re} année
AYMARD (F.F.)	Physiologie
BARNIER (Mlle S.) (F.F.)	Mathématiques
BERNARD (Mlle J.)	T.P. Microbiologie
BESANÇON P. (F.F.)	Mathématiques
BIGET (Mme M.-P.) (F.F.)	Mathématiques
BLANC (Mme P.)	E.D. Chimie Organique
BONALY (Mme J.) (F.F.)	T.P. Botanique
BOURNIQUE (Mlle C.) (F.F.) ..	T.P. Physiologie Végétale 2 ^e année
BRALET M. (F.F.)	T.P. Zoologie 1 ^{re} année
CARLIER A.	C.E.S. Pharmacie Galénique Industrielle
CARRE D. (F.F.)	Chaire de Physique (Mathématiques)
CENAC (Mme J.) (F.F.)	C.E.S. Parasitologie Pharmaceutique et Technique
CHARPENTIER (Mme M.)	E.D. Chimie Minérale et Générale 1 ^{re} année
CHOIX (Mlle M.)	T.P. Pharmacie Galénique 3 ^e année
CLAIR (Mlle G.) (F.F.)	E.D. Essais des drogues végétales
COMPAGNON P. (F.F.)	E.D. Chimie Organique
DAGRON Ch.	E.D. Chimie Générale et Minérale 2 ^e année
DAVY J. (F.F.)	C.E.S. Biochimie
DECAUDIN (Mlle M.-Th.)	T.P. Parasitologie 4 ^e année
DEL COURT A. (F.F.)	T.P. Botanique
DREUX C.	C.E.S. Electrochimie Appliquée à l'Analyse
DUMANT (Mlle G.)	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Physico-Chimie)
DUCLOS J.-P.	Chaire de Chimie Organique
DUPONT (Mme Ch.)	T.P. Pharmacodynamie 4 ^e année
ETIENNE G.	T.P. Pharmacie Galénique 2 ^e et 3 ^e années
FAURE (Mme L.) (F.F.)	E.D. Chimie organique 1 ^{re} année
FLEURY (Mlle S.)	E.D. Chimie Analytique Qualitative
FOGLIETTI (Mlle A.-M.) (F.F.) ..	T.P. Chimie Biologique 3 ^e et 4 ^e années
GAYRAL P. (F.F.)	Zoologie 1 ^{re} année
GOURSAT (Mlle M.-J.) (F.F.) ..	E.D. Botanique 1 ^{re} année
HAMON M.	T.P. Chimie Analytique Quantitative
HARISPE J.	T.P. Chimie Organique 2 ^e année
HENRY J.	T.P. Chimie 4 ^e année
HUBERT (Mme J.)	C.E.S. Bactériologie Pharmaceutique et Technique
JULIEN R. (F.F.)	E.D. Chimie Générale et Minérale
JUND (Mlle Y.)	C.E.S. Microbiologie
LALEGERIE P. (F.F.)	C.E.S. Biochimie
LAROCHE J.	T.P. Physique 2 ^e année
LEBŒUF M. (F.F.)	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique

LEDUC (Mme Y.)	T.P. Chimie 4 ^e année
LEGER (Mme N.)	Parasitologie 4 ^e année
LELUC R.	T.P. Microbiologie 4 ^e année
LEMONNIER A.	T.P. Chimie Analytique Quantitative
LEVILLAIN P.	E.D. Chimie Analytique
LIKFORMAN J.	E.D. Physique 1 ^{re} année
LONGEVIALLE (Mlle M.)	E.D. Botanique 1 ^{re} année
MACCARIO J. (F.F.)	Mathématiques 1 ^{re} année
MAHUZIER G. (F.F.)	T.P. Chimie Analytique Qualitative
MANDEREAU J.	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
MARTIN FRERES F.	T.P. Chimie Minérale 1 ^{re} année
MAUGUEN Y. (F.F.)	Chaire de Physique
MICHELET (Mlle A.) (F.F.)	E.D. Chimie Générale et Minérale 2 ^e année
MORIN (Mlle H.)	C.E.S. Pharmacodynamie et Essais Biologiques des Médicaments
MOULIN P. (F.F.)	T.P. Physique 1 ^{re} année
N'GUYEN PHU LICH (F.F.)	C.E.S. Toxicologie et Etudes Sanitaires
NOTTEGHEM (Mme J.) (F.F.) ..	T.P. Zoologie 1 ^{re} année
PARIS M.	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Biologie)
PRESTIS J.	T.P. Anatomie et Physiologie 2 ^e année
POULLAIN P.	C.E.S. Hématologie
QUENEZ P. (F.F.)	Chaire de Chimie Générale et Minérale
ROBERT (Mme M.)	C.E.S. Immunologie Générale et Appliquée
RODIER N. (F.F.)	T.P. Physique 2 ^e année
ROLLEN (Mlle A.)	T.P. Botanique 1 ^{re} année
ROUSSELET F.	Biochimie Appliquée
ROUSSELET (Mlle R.) (F.F.)	T.P. Essais des Drogues Végétales
SEILLER (Mme F) (F.F.)	C.E.S. Pharmacie Galénique et Industrielle
STRUPLER (Mlle N.)	T.P. Chimie Générale et Minérale 1 ^{re} année
THUONG CONG TRIEU	T.P. Chimie Analytique Quantitative
TROUPEL (Mlle S.) (F.F.)	T.P. Chimie Analytique Qualitative
VIERFOND J.-M. (F.F.)	E.D. Chimie Organique 1 ^{re} et 2 ^e années
VILLERS J. (F.F.)	Physique

BIBLIOTHEQUE

RUYSSEN (Mlle Y.)	Conservateur en Chef, ✱
LAVAUD (Mlle S.)	Conservateur, ✱
DESGRIPPES (Mme A.)	Conservateur
BOUVRESSE (Mlle A.-M.)	Bibliothécaire
COULET (Mme M.-A.)	Bibliothécaire

A Monsieur le Professeur Maurice Louis GIRARD

Professeur de Biochimie Appliquée
à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien-Chef de l'Hôpital Lariboisière,

Chevalier de la Légion d'Honneur,

qui, par la voie de la biologie hospitalière a su faire naître en nous l'attrait de la recherche méthodique. Il a été et restera pour nous le grand exemple du dévouement, de la ténacité et de la probité scientifique.

Ce travail est le fruit de sa confiance.

Qu'il veuille trouver ici, ainsi que Madame GIRARD, le témoignage de notre immense gratitude et de notre indéfectible attachement.

A Monsieur Jean Emile COURTOIS

Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien-Chef de l'Hôpital Laënnec,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

dont la haute autorité nous a fait l'honneur de juger ce travail.

Qu'il accepte de voir ici l'attestation de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur Yves COHEN

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

qui a bien voulu nous faire l'honneur d'examiner nos recherches.

Nous le prions de trouver ici l'expression de nos remerciements dévoués.

A Monsieur François ROUSSELET

Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Paris,

qui, après nous avoir initié à la belle méthode de spectrophotométrie par absorption atomique, a été l'animateur de tous les instants de ce travail.

Qu'il trouve ici l'assurance de notre fidèle amitié et de notre gratitude.

A Monsieur Pierre ROHRBACH et à Mademoiselle Marie-Jeanne LAROCHE

dont les conseils incessants et l'aide efficace nous ont permis de réaliser l'expérimentation animale qui a été le support d'une grande partie de ce travail.

En témoignage de nos remerciements.

A mon Epouse,

sans qui cette thèse n'aurait jamais été réalisée.

Je lui dédie ce travail avec toute ma tendresse et mon affection.

A mon Fils Olivier et à ma Fille Hélène.

**SUR QUELQUES ASPECTS
DU METABOLISME DU CUIVRE
CHEZ LE RAT
ET EN BIOLOGIE HUMAINE**

AVANT-PROPOS

Dans la pratique hospitalière journalière, nous avons eu à déterminer fréquemment la concentration en céruléoplasmine et en cuivre sériques. La discussion et l'interprétation des résultats, leur confrontation avec la clinique nous ont poussé à nous informer plus avant, par des investigations bibliographiques de l'importance et du rôle du cuivre en biologie.

Nous avons été, d'ailleurs, d'autant plus facilement entraîné dans cette voie qu'au Laboratoire de Biochimie appliquée François ROUSSELET améliorerait largement les possibilités instrumentales de la spectrophotométrie d'absorption atomique qui lui permettait d'étendre aux milieux biologiques les facilités offertes par une méthode hautement sensible et sélective. Après celle du calcium et magnésium la mise au point du dosage du cuivre avait retenu plus particulièrement l'attention, elle permet notamment de pratiquer les déterminations sur des échantillons de très petite taille avec une rapidité qui rend possible le traitement de grandes séries.

En possession d'une technique à la fois fine et reproductible du dosage du cuivre, nous nous sommes attaché, sous l'impulsion puis sous la direction du Professeur Maurice Louis GIRARD, à étudier quelques aspects mal connus du métabolisme du cuivre.

Deux étapes essentielles ont jalonné notre travail :

- étude de la distribution sanguine, de la répartition tissulaire et de l'élimination du cuivre chez l'animal selon les voies d'administration et la nature des molécules porteuses du métal. L'expérimentation a été conduite dans le double but de définir une posologie convenable du cuivre et de mieux connaître la régulation de son taux dans l'organisme ;
- étude qualitative, puis quantitative des liaisons contractées par les protéines sériques avec le cuivre, destinée à délimiter des « compartiments du cuivre circulant » pour mieux définir le cuivre physiologiquement actif.

Je tiens à exprimer ici le témoignage de ma reconnaissance à l'équipe universitaire et hospitalière du Professeur M.L. GIRARD, et plus particulièrement à Jacques CANAL, Françoise PAOLAGGI, Claudine SORIA et Jacques DELATTRE, qui ont su contribuer si efficacement à effacer les heures de découragement et à faciliter la résolution de bien des problèmes.

Ma reconnaissance va également à Mme GUERALT, à Mme GOMET et à Mme DUNAND pour leur amicale participation à la mise en page de ce texte.

PREMIERE PARTIE

ETAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA BIOCHIMIE DU CUIVRE

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude du cuivre dans la matière vivante depuis plus de cinquante ans.

Déjà GUERITHAULT, en 1913, fait jouer au cuivre un rôle décisif chez les végétaux, « élément migrateur vers les secteurs biologiques à activité vitale intense, présent dans toute la plante, accumulé dans la graine, à une concentration maximale dans le germe... »

Jules RAULIN, Gabriel BERTRAND, puis JAVILLIER (1) pionniers de la biochimie des éléments qu'ils traitent alors de « mineurs » non seulement reconnaissent au cuivre une présence très générale dans les organismes vivants, mais surtout classent ce métal parmi les « éléments biogènes », c'est-à-dire physiologiquement indispensables.

Depuis, les aspects les plus nombreux et les plus variés du rôle du cuivre dans les systèmes biologiques ont été décrits grâce aux apports de biologistes et de cliniciens comme de physiciens et de chimistes.

C'est qu'en fait l'histoire du cuivre biogène s'est élaborée lentement par suite de la nature des problèmes analytiques et cliniques posés par l'étude de ce métal.

Les difficultés analytiques, propres à l'élément lui-même, se trouvent accrues par la faiblesse des concentrations rencontrées et par la présence très générale de ce métal masquant la discrimination entre des variations physiologiques d'amplitude souvent faible, et l'intervention d'un agent de contamination.

La pathologie par ailleurs est difficile à définir, sauf dans le cas de la maladie de Wilson où les perturbations du métabolisme du cuivre constituent un des signes biologiques majeurs. En effet, de nombreuses affections dont le seul dénominateur commun semble être le caractère inflammatoire, entraînent systématiquement des variations parfois importantes du taux de cuivre sérique.

Or, si les essais d'interprétation de la maladie de Wilson ont conduit à une meilleure connaissance du métabolisme normal, le groupe des affections inflammatoires n'a jusqu'alors donné lieu qu'à de simples constata-

tions sans définition des rapports entre la présence du cuivre et la cause de l'affection.

Il apparaît en outre que la majorité des études a été menée jusqu'à présent dans une optique plus statique que dynamique. Aussi avons-nous pensé à apporter à la connaissance du cuivre en biologie une contribution personnelle en plaçant plus volontiers notre étude sur le plan dynamique, nous proposant d'éclaircir certains aspects du métabolisme du cuivre chez le Rat, puis chez l'Homme.

I. — ASPECTS PHYSIOLOGIQUES.

Récemment, certains auteurs ont tenté de faire une synthèse des travaux sur le rôle du cuivre dans les systèmes biologiques. Les publications de WALSHE en Angleterre (2), de SCOTT et DEMPSEY aux Etats-Unis (3) nous semblent constituer les revues les plus exhaustives sur ce problème et sur les acquisitions réalisées.

Le premier auteur a surtout été inspiré par les incidences hépatiques du métabolisme du cuivre, dans la mesure où celles-ci pouvaient éclairer l'étiologie de la maladie de Wilson. Quant aux travaux de SCOTT et DEMPSEY ils présentent des aspects plus généraux du métabolisme normal et pathologique chez l'Homme.

De cette confrontation, le rôle biologique du cuivre reste pratiquement indéfini, jusqu'aux environs de 1950, date à laquelle les pionniers comme CARTWRIGHT, ADELSTEIN et VALLEE, UNDERWOOD et WINTROBE, etc., ont pu aborder le problème avec des moyens modernes d'étude.

A) LOCALISATION DU CUIVRE.

Si tous les tissus contiennent du cuivre, un certain nombre d'entre eux seulement sont capables de manifester une certaine plasticité vis-à-vis de l'élément. Notre expérience personnelle montrera que, si l'on provoque soit une carence, soit une surcharge en cuivre, après administration par voie orale ou par voie parentérale, seuls le foie, les reins et le sang accusent des variations concomitantes. L'encéphale, pourtant riche en cuivre, notamment au niveau de sections pigmentées comme les locus niger et céruléus, ne montre pas cependant de modifications (4) (5) appréciables, quand une surcharge fait varier de quatre fois le taux de cuivre hépatique et de deux fois le taux de cuivre rénal. Il en est de même dans le cas d'une carence prolongée.

Il ne semble donc pas exister de rapport entre la richesse en cuivre d'un organe et l'aptitude de celui-ci à faire varier son propre taux. La rate, le cerveau, le cœur, le tissu musculaire, organes physiologiquement plus riches en cuivre que le foie (6) ne présentent pas cependant de variations de concentrations comparables à celles de ce dernier.

Comme nos propres expériences de carence et de surcharge l'indiqueront, le foie apparaît donc comme le secteur le plus sensible du métabolisme, puisqu'il semble aussi bien capable de capter le métal que de le céder. Il

convient cependant de noter qu'en valeur absolue la vitesse et la capacité de fixation dépassent largement celles de libération.

Ce rôle actif du foie vis-à-vis du cuivre est d'ailleurs physiologiquement illustré, comme l'ont montré BRUKMANN et ZONDEK (7) en 1940, puis AXTRUP (8) en 1946, par l'importance du stockage hépatique à la naissance environ dix fois plus grande qu'à l'âge adulte, où le taux se stabilise aux environs de 8 mg (CHOU et ADOLPH) (9).

En fait, si dans les organes à teneur constante en cuivre, celui-ci peut être considéré comme élément constitutif du tissu, dans le foie, l'élément se trouve réparti en deux fractions :

- 1° une fraction constitutive qui varie peu, même si le sujet est astreint à une carence alimentaire prolongée ;
- 2° une fraction de stockage plus labile à partir de laquelle s'élabore le secteur métabolique par intégration du cuivre à des métalloprotéines comme la céruléoplasmine qui représente le principal compartiment circulant du cuivre. Cette fonction n'apparaît que progressivement dans le foie du jeune enfant, observation que l'on peut rapprocher des constatations d'AXTRUP sur le taux du cuivre hépatique chez le nouveau-né.

Il existe apparemment un équilibre entre la fonction de stockage et celle de la synthèse de la céruléoplasmine, équilibre inexistant dans la maladie de Wilson où la grande affinité de la cellule hépatique pour le cuivre restant intacte, l'impossibilité de synthèse de la protéine interdit l'extraction du métal à partir du parenchyme hépatique et conduit au processus de dégénérescence cirrhotique, caractéristique de la maladie comme de l'intoxication cuivrique.

Certains auteurs, à la suite de MORELL (10), admettent que le foie, en dehors de sa facilité à capter le cuivre, est aussi capable d'incorporer ce métal à une protéine tissulaire propre à l'organe, l'hépatocupréine. Cette dernière protéine pourrait fonctionner soit comme donneur spécifique de cuivre à la céruléoplasmine, soit comme précurseur dans la synthèse de la céruléoplasmine.

B) QUELQUES ASPECTS FONDAMENTAUX DU TRANSPORT DU CUIVRE.

La biologie du cuivre est intimement liée à celle des protéines. L'affinité de l'ion cuivrique pour ces dernières dépend essentiellement des caractéristiques suivantes :

- **caractère acide**, marqué par la place occupée dans l'échelle acido-basique de LEWIS, qui rend Cu^{2+} apte à réagir avec les groupements basiques libres des protéines,
- **propriétés oxydantes**, définies par la valeur du potentiel redox du système $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, expliquant la facile réactivité avec les groupements sulphydrylés des protéines,
- **constitution du cortège électronique** aussi bien que valeur de l'électro-positivité, qui font du cuivre un bon accepteur de doublets d'électrons portés tant par l'azote que par l'oxygène et le soufre protéique. De

cette propriété dépend la possibilité de formation de nombreux complexes.

L'affinité de l'ion cuivrique pour les protéines, résultant de l'ensemble des propriétés remarquables précédentes, explique l'impossibilité de mise en évidence d'un cuivre inorganique ionisé, c'est-à-dire libre.

D'après la force des liaisons ainsi contractées, il est plausible d'imaginer une échelle d'affinité des protéines pour le cation, aux pôles de laquelle URIEL (11) place deux groupes principaux de systèmes à cuivre : les **métalloprotéines** et les **complexes métalloprotéiques** :

Les **métalloprotéines** dans lesquelles le métal fait intégralement partie de la molécule au point que la réversibilité de la réaction



est pratiquement nulle. En effet, pour rompre la stabilité du complexe et libérer le cuivre, il convient de faire appel soit à la dénaturation, soit à la destruction de la molécule. Dans de tels composés, le cuivre est localisé sur des sites déterminés qui définissent aussi bien le nombre que les positions respectives des atomes engagés. Cette propriété confère aux sites un rôle de véritable « centre actif ». En outre, elle rend compte de la spécificité et le plus souvent de l'activité biochimique de ces complexes.

Les **complexes métalloprotéiques**, à l'autre extrémité de l'échelle d'URIEL, présentent au contraire un caractère de réversibilité, avec récupération éventuelle de la protéine native après rupture du complexe. Ces composés n'ont pas de spécificité particulière dans le sens où, selon les conditions physico-chimiques du milieu, ils peuvent fixer des proportions croissantes de métal jusqu'à fournir des complexes de nature insoluble.

Ces précédentes considérations ont engagé de nombreux auteurs, comme KEIDERLING (12) en 1950, BEARN et KUNKEL (13) en 1954, à envisager deux « compartiments » pour le cuivre circulant :

- un cuivre lié à l'albumine d'une façon labile entrant dans la constitution des complexes métalloprotéiques ;
- un cuivre irréversiblement intégré à la céruléoplasmine qui appartient au groupe des métalloprotéines.

Le premier auteur appelle « cuivre albuminique » celui qui, après surcharge in vitro d'un sérum, réagit directement avec le diéthylthiocarbamate de sodium, parce que la stabilité du complexe protéique formé est inférieure à celle du complexe diéthylthiocarbamate de cuivre ; ces complexes sont cependant assez stables pour ne pas être dissociés quand le sérum qui les contient est dialysé contre une solution tampon de pH 7,4. Nous verrons cependant que la labilité du cuivre dit albuminique n'est que relative, en particulier que sa liaison avec la protéine ne peut être rompue que si on l'oppose à un système fournissant avec le métal un complexe de pK très élevé.

Les seconds auteurs étudient la localisation du métal sur les fractions protéiques sériques de rats, à l'aide de surcharges par voie orale, de ^{64}Cu . Il en résulte, après séparation électrophorétique sur gel d'amidon, que le maximum de radioactivité se situe d'abord sur le pic des albumines puis

qu'il diminue à ce niveau en fonction du temps, au profit des α_1 globulines, dans la zone où la réaction oxydasique avec la para-phénylène-diamine révèle la présence de la céruléoplasmine.

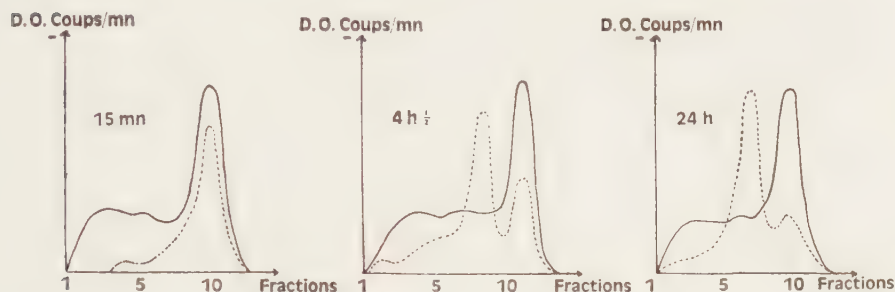


FIG. 1. — Evolution de la courbe de radioactivité en fonction du temps, comparée au diagramme électrophorétique du sérum de Rat, après administration de ^{64}Cu par voie orale. (D'après BEARN et KUNKEL.)

..... Variation de la radioactivité.
 — Diagramme protéique.

Les courbes de la figure 1, d'après BEARN et KUNKEL, représentent les variations du nombre de coups par minute en fonction du temps, superposées au diagramme électrophorétique, qui témoignent effectivement de cette translation du maximum de radioactivité.

Il est, par ailleurs, démontré, en 1959 par MARKOWITZ (14) et en 1961 par STERNLIEB (15), que le cuivre céruléoplasmique ne réagit pas directement avec le diéthylthiocarbamate de sodium comme dans le cas des composés albuminiques. Pour que la réaction ait lieu, il faut l'intervention d'un agent aussi complexant que le cyanure de potassium (16).

1° Cuivre céruléoplasmique.

C'est aux chercheurs scandinaves, HOLMBERG et LAURELL (17) (18) (19) (20) que revient le mérite, dès 1947, d'avoir donné à la notion de cuivre biochimique sa véritable dimension. Ils isolent et caractérisent, à partir d'un plasma de porc, la fraction protéique du sérum colorée en bleu que constitue la céruléoplasmine. Ils lui reconnaissent d'emblée la propriété de transporter la presque totalité du cuivre circulant chez les mammifères.

Cette découverte présente un double intérêt :

- celui d'avoir isolé un substrat biochimique spécifique au cuivre, à partir duquel il a été possible d'envisager d'autres aspects métaboliques ;
- celui surtout d'avoir engagé les biologistes et les cliniciens dans une tentative, qui s'avère de jour en jour plus fructueuse, pour élucider l'étiologie de la maladie de Wilson. Bien que cuivre et céruléoplasmine soient à eux seuls impuissants à expliquer l'ensemble du schéma de l'affection, leur sort cependant est parfaitement lié à celle-ci et en domine les aspects biologiques essentiels.

De mobilité électrophorétique variable suivant les espèces, la céruléoplasmine migre en première approximation avec les α_2 globulines chez l'Homme, avec les α_1 globulines chez le Rat. Elle présente, en effet, un certain polymorphisme, et il est possible de mettre en évidence au moins deux composants possédant chacun une activité oxydasique propre vis-à-vis de la paraphénylènediamine, selon les supports utilisés pour la migration électrophorétique, comme l'ont montré KASPER et DEUTSH (21), puis AISEN et MORELL (22).

Les déterminations de la teneur en cuivre et du poids moléculaire de la protéine (151 000) mettent en évidence la présence de 8 atomes de cuivre par molécule, complètement intégrés à cette dernière.

Cette intégration non nuancée semblerait indiquer que la céruléoplasmine ne pourrait pas se comporter comme la forme de transport du cuivre actif, selon la remarque de STEINBUCH (23). Le problème reste cependant en suspens, car il est possible comme nos expériences personnelles le montreront plus loin, de faire apparaître un certain pourcentage de cuivre céruléoplasminique susceptible d'être mobilisé à partir de la molécule dans des conditions particulières. C'est d'ailleurs la notion suggérée par l'expérience suivante :

- quand on oppose à une préparation de céruléoplasmine de l'acide ascorbique, on observe une décoloration de la protéine cuivrique. L'analyse du produit restant dénote la présence de 4 atomes de cuivre seulement sur les 8 qui figuraient dans la protéine native qui a perdu en même temps son activité oxydasique. Un phénomène analogue a été observé par CURZON (24) après protéolyse chymotrypsique de la céruléoplasmine. Ces observations laissent à penser que les 4 atomes de cuivre sont situés dans la partie non superficielle de la molécule.

Soulignons d'ailleurs que les réactions de décoloration envisagées plus haut se trouvent mises à profit dans de nombreuses méthodes de dosage de la céruléoplasmine (25) (18) par voie directe.

La présence des 8 atomes de Cu supposée indispensable à l'activité oxydasique, apparenterait la céruléoplasmine à de nombreuses autres oxydases et permettrait de reconnaître à celle-ci une véritable « fonction enzymatique » s'exerçant d'une façon prépondérante dans le milieu circulant, contrairement à la majeure partie des autres enzymes dont l'activité est endocellulaire.

HOLMBERG et LAURELL ont pu faire apparaître cette capacité de catalyse non spécifique vis-à-vis de substrats variés dont certains ont une origine physiologique comme la dopamine, l'adrénaline (26), l'acide ascorbique, substrats possédant par ailleurs des oxydases spécifiques, elles-mêmes métalloprotéines à cuivre.

Il s'agit donc d'un enzyme polyvalent et, dans l'état actuel des connaissances, rien ne permet de soupçonner l'existence d'un substrat spécifique.

Il est possible, néanmoins, de comprendre l'intérêt biologique de cette protéine, grâce aux deux observations suivantes :

a) **93 % du cuivre circulant se trouve associé à la céruléoplasmine.** Pourtant, comme le prétendent CARTWRIGHT et WINTROBE (6), cette forme de liaison protéique ne paraît pas être en équilibre avec un autre compartiment de l'organisme, laissant ainsi entrevoir l'impossibilité d'une telle métal-loprotéine à se comporter comme donneur de cuivre envers différents systèmes accepteurs.

Connaissant in vitro la propriété oxydasique caractéristique de la céruléoplasmine, ne serait-il pas cependant possible d'envisager que le rôle in vivo de cette protéine à cuivre soit lié à une réaction analogue mobilisant 4 atomes de cuivre ?

Il reste également à prouver l'assertion des mêmes auteurs concernant le rôle actif de l'albumine dans le transport des 7 % de cuivre sérique total restant.

b) **Dans la maladie de Wilson, il y a corrélation entre la répartition générale anormale du cuivre et l'absence de céruléoplasmine.** Il semble logique de songer que, vis-à-vis du métal, cette protéine exerce une activité de régulation, sinon de détoxication pour maintenir le taux de cuivre dans des limites physiologiques. La balance de cuivre tissulaire est, en effet, très fortement positive, notamment dans le foie et le cerveau ; la cupurie constamment très augmentée est un signe supplémentaire de l'absence de protéine porteuse.

Cependant, dans l'état actuel des connaissances, il est impossible d'attribuer à l'acéruléoplasminémie de la maladie de Wilson la cause profonde de l'affection. Certains auteurs comme UZMANN et Coll. (27), PORTER et FOLCK (28) suggèrent l'existence de protéines hépatiques et cérébrales très avides du métal, capables de dévier la destinée de ce dernier au détriment de la céruléoplasmine qui, n'ayant plus de fonction propre à exercer, ne serait plus synthétisée. S'il en était ainsi, la maladie de Wilson serait beaucoup plus une affection du cuivre que de la céruléoplasmine. Il s'agit, en fait, d'un trouble génétique dans lequel il est encore impossible de discerner si le gène en cause règle une synthèse anormale ou en inhibe une autre, de caractère physiologique.

2° Cuivre non céruléoplasmique.

Il est malaisé d'expliquer de nombreux phénomènes où intervient le cuivre comme élément actif, si l'on se satisfait des deux systèmes classiques mis en évidence par BEARN et KUNKEL : systèmes dits albuminique et céruléoplasmique. Notamment, de ces deux compartiments circulants où les complexes du cuivre sont de stabilité très différente, il est difficile, sinon impossible d'en choisir un qui serait donneur de cuivre aux systèmes susceptibles d'accepter cet élément. Le cuivre est un poison d'enzymes trop fort pour envisager que les 7 % du métal circulant appartenant au compartiment dit albuminique soient entièrement et à tout moment disponibles pour être captés par des systèmes exerçant une activité chélatrice intense, tels les enzymes à groupement -SH.

De là découle la nécessité d'envisager au moins un type de complexe de stabilité intermédiaire entre les complexes albuminique et céruléoplasmique.

Une telle forme jouerait alors le rôle de tampon entre le cuivre albuminique labile et les systèmes à affinité plus grande. En 1967, NEWMANN et SASS-KORTSAK (29) ont mis en évidence, dans le sérum humain, une fraction de cuivre liée à des acides aminés, formant entre 0,2 et 0,4 % du cuivre sérique total. Cette fraction est obtenue à partir du surnageant d'un sérum soumis à l'ultra-centrifugation. Il ne s'agit pas d'un cuivre lié aux protéines, le surnageant ne donnant aucune réaction avec l'acide sulfosalicylique, ni d'un cuivre libre. Les auteurs suggèrent qu'il soit lié à la fraction d'acides-amino normalement présente dans le sérum, car si on ajoute des amino-acides au sérum avant de réaliser l'ultra-centrifugation, le taux de cuivre dans le surnageant augmente proportionnellement au taux d'acides-amino supplémentaire. Les amino-acides ont, en effet, la propriété de former très aisément des complexes avec l'ion cuivrique (30) (31) (32), pouvant par suite entrer en compétition avec l'albumine selon la succession d'équations suivantes :

1. Albumine + $\text{Cu}^{++} \rightleftharpoons$ Complexe Albumine-cuivre.
2. Amino-acides + $\text{Cu}^{++} \rightleftharpoons$ Amino-acides-cuivre.
3. Albumine-cuivre + Amino-acides $\rightleftharpoons$ Complexe Amino-acides-cuivre + Albumine.

Ces suggestions s'avèrent très fructueuses puisque cette équipe de chercheurs, dans une seconde publication (33), montre que la teneur en amino-acides du milieu nutritif exerce une influence importante sur l'introduction de cuivre dans des foies isolés de rats.

Ce nouveau compartiment satisfait déjà mieux la nécessité d'un système à la fois transporteur et donneur de cuivre pour les tissus. Cette notion de fraction liée aux acides aminés est d'autant plus séduisante que chacun de ces derniers est susceptible de former avec l'ion Cu^{++} un complexe de type particulier et surtout de stabilité définie. L'addition des différents amino-acides à un sérum surchargé en ^{64}Cu , de façon que le rapport Alb/Cu soit égal à l'unité a permis à SASS KORTSAK de définir une hiérarchie d'acides aminés en fonction du taux de cuivre retenu par chacun d'eux, c'est-à-dire présent dans le surnageant d'ultra-centrifugation. Par ordre décroissant, l'histidine, la glutamine, la thréonine et la cystine manifestent la meilleure activité de chélation.

L'ensemble de ces considérations a été à la base de notre étude sur les forces de liaison du cuivre et des protéines sériques. Comme nous le montrerons dans la troisième partie de ce travail, le problème des compartiments métaboliques du cuivre circulant ne peut pas être résolu en accordant simplement à chaque grande fraction protéique une affinité fixe pour le cuivre. Il nous sera, en effet, possible de considérer qu'à une même fraction protéique correspondent plusieurs types de liaisons d'intensité différentes.

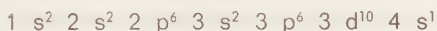
On voit donc que, dans ses fractions circulantes, le cuivre se trouve intimement lié aux protéines. Il ne semble pas exister d'interrelations avec d'autres groupes de molécules biologiques comme les acides gras, par exemple.

3° Notions récentes sur les types de liaisons du cuivre et des molécules porteuses de ce métal.

C'est grâce aux théories physico-chimiques modernes, comme celles des champs cristallins et des orbitales moléculaires déjà pressenties par celles des acides et bases de LEWIS, qu'il a été possible d'envisager quelques modèles de structure de complexes biologiques simples.

En effet, la théorie désormais classique de LEWIS admet que tout ion ou molécule pouvant jouer le rôle d'accepteur d'un ou plusieurs doublets électroniques a une valeur d'acide. Un tel individu chimique doit contenir au moins un atome à propriété électrophile, caractérisé par une lacune électronique. Dans cette optique, tout atome ou groupement susceptible de lui conférer un doublet se comportera vis-à-vis de lui comme une base.

Or le cuivre élémentaire est caractérisé par un cortège électronique de 29 électrons, qu'on peut schématiser de la façon suivante :



Dans l'ion Cu^{2+} , la séquence s'achevant par 3 d⁹ compte 29 électrons. Si on compare Cu^{2+} au krypton, gaz rare qui le suit dans la classification, il est en défaut de 9 électrons : il se rapprochera de ce dernier en s'octroyant 4 doublets électroniques. Il s'avère, en effet, que la plupart des complexes du cuivre ont l'indice de coordination 4.

Les théories physiques des ligands ou groupements coordonnés et des orbitales moléculaires ont considérablement fait progresser ces notions, en permettant notamment d'évaluer la stabilité de telles liaisons. Elles mettent à profit les résultats élaborés dans le cadre de la Mécanique Ondulatoire, selon laquelle la liaison chimique est l'aboutissement de la combinaison linéaire d'orbitales atomiques en orbitales moléculaires. Pour rendre compte des énergies de liaison et surtout de la structure géométrique des molécules, PAULING fait appel à la notion d'hybridation des différentes orbitales atomiques d'un élément : nouvelles combinaisons linéaires d'orbitales atomiques qui satisfont aux trois conditions suivantes :

- chacune d'elles permet d'obtenir des forces de liaison supérieures à celles des meilleures orbitales atomiques non hybridées ;
- elles sont égales entre elles, par conséquent équivalentes ;
- elles sont enfin orthogonales, condition qui détermine leurs directions respectives, donc celles des liaisons qui seront échangées. Si l'on représente les cases quantiques du Cu^{2+} sous la forme :



l'éviction de l'électron célibataire de 3 d en 5 s permet l'obtention de 4 orbitales hybrides dsp^2 qui rend compte de la structure carrée plane d'un complexe formé, par exemple, par l'addition d'ammoniaque à une solution de sulfate de cuivre, où les 4 liaisons réalisées par la mise en place de 4 doublets provenant de l'azote sont bien équivalents.

La théorie des ligands, à partir de ces données fondamentales tend essentiellement à décrire et à chiffrer les perturbations apportées aux niveaux énergétiques de ces orbitales hybrides par l'effet de champ créé au moyen des charges propres aux groupements ligands, donneurs des doublets d'électrons. Cette inter-relation des orbitales du métal avec les électrons des ions ou groupements qui l'environnent est important dans la mesure où elle rend ces orbitales plus réactives, donc plus aptes à réaliser des liaisons stables. Ceci explique que, pour un métal, la stabilité d'un complexe dépend beaucoup de la nature des ligands, qu'en particulier elle sera plus grande avec des ligands à champ fort qu'à champ faible. Plusieurs auteurs ont abordé ces dernières années, tant à l'aide de la diffraction des rayons X que de la résonance paramagnétique électronique, l'étude de quelques complexes organiques du cuivre, notamment FREEMAN (34) et BLUMBERG (35) dont les publications sont réunies dans le compte rendu du Symposium sur la biochimie du cuivre, tenu en 1965 à New York. Ces chercheurs ont élaboré des modèles de complexes du cuivre avec quelques peptides. Il y est, en particulier, montré que des différentes géométries possibles d'un complexe donné, celle dont les orbitales moléculaires ont les plus hauts niveaux d'énergie, est la plus stable, comme on pouvait s'y attendre.

Dans les amino-acides, les peptides et les protéines, les ligands les plus actifs sont ceux contenant dans l'ordre décroissant du soufre, de l'azote et de l'oxygène. Or, les positions respectives de chacun de ces atomes dans une molécule donnée sont déterminées par au moins deux facteurs :

- la nature du groupement auquel ces atomes appartiennent ;
- la place du groupement sur la molécule qui possède elle-même sa propre configuration spatiale.

Il est ainsi loisible de concevoir une stabilité prédominante des complexes formés à partir de molécules où les positions des atomes liants sont les plus aptes à réaliser, avec l'ion coordonnant, l'échange de liaisons sous forme d'orbitales moléculaires dont le niveau d'énergie est le plus proche de celui des orbitales moléculaires idéales.

Ces notions sommaires, bien qu'en pleine évolution, permettent au moins d'expliquer deux phénomènes :

- l'existence de plusieurs formes biologiques de cuivre selon les stabilités respectives des complexes qu'il suscite ;
- la diminution de stabilité d'un complexe donné, voire la libération du métal si l'on joue sur différents paramètres physico-chimiques tels que pH, force ionique des solutions, température, etc. Les variations de ces facteurs, non seulement modifient l'état d'hydratation de la molécule, mais surtout font varier les charges portées par les ligands, perturbant ainsi leur effet de champ, diminuant le niveau d'énergie des orbitales de liaison. De même, ces facteurs agissent sur la configuration de la protéine, qui, dans le cas d'une structure hélicoïdale, par exemple, peut subir une diminution ou une augmentation du pas de l'hélice par variation des angles de valence du chélate.

On peut alors concevoir l'existence d'au moins trois facteurs essentiels de stabilité de liaison des complexes avec le cuivre :

- la richesse en soufre, en azote, en oxygène ;
- la disposition de ces atomes sur l'acide aminé puis de l'acide aminé sur la protéine ;
- la configuration spatiale de la protéine.

Ces théories physico-chimiques modernes admettant l'existence de types variés de liaison du cuivre avec les protéines du sérum sont en bonne concordance avec les observations des biologistes et les conclusions de notre travail mettant expérimentalement en évidence différents compartiments du cuivre circulant.

C) PROTEINES TISSULAIRES ET ENZYMES A CUIVRE.

Les tissus contiennent des systèmes à cuivre dont la synthèse se trouve réalisée in situ. Il s'agit essentiellement de certaines protéines spécifiques à cuivre ainsi que d'une gamme assez variée d'enzymes admettant le cuivre comme cofacteur. HARRIS et SASS-KORTSAK (33) suggèrent que des molécules à bas poids moléculaires comme les complexes Cu-acides aminés sont en équilibre à la fois avec les fractions labiles du plasma et avec les protéines tissulaires. La petite taille de tels complexes leur permettrait de franchir les membranes cellulaires.

1° Protéines tissulaires à cuivre.

Nous n'insisterons pas sur le cas de la céruléoplasmine. Bien que présente dans le foie, comme d'ailleurs dans le rein où HEIDELBERGER et MAC PHERSON (36) l'ont mise en évidence par voie immunologique, celle-ci constitue surtout une fraction circulante du métal. Elle peut, néanmoins, se situer à la charnière entre les transporteurs de cuivre et les protéines tissulaires, d'une part par la relative inertie de ses atomes métalliques, des protéines tissulaires et des métalloprotéines, d'autre part, par son activité oxydasique.

Les protéines tissulaires à cuivre peuvent se diviser en deux groupes :

- a) **le premier est constitué de protéines à cuivre**, solubles, incluses, dans le compartiment subcellulaire des tissus. Il s'agit de la cérébrocupréine, de l'hépatocupréine de l'adulte et de l'érythrocupréine ;
- b) **le second type est représenté par la mitochondrocupréine hépatique du nouveau-né** qui, comme son nom l'indique, se localise dans la fraction cellulaire mitochondriale.

Ces protéines tissulaires à cuivre constituent un secteur important du cuivre biologique ; les trois premières citées renferment environ 60 % du cuivre total de leurs tissus, comme l'ont mis en évidence PORTER et Coll. (37) (38). Elles présentent une certaine homogénéité d'abord par le taux de cuivre qu'elles renferment, taux sensiblement identique et de l'ordre de 0,4 %. En outre, leur poids moléculaire respectif est très proche de 30 000. Ces données laisseraient à penser qu'il s'agit en fait d'une seule et même protéine, si les mêmes auteurs ne suggéraient pas une certaine différence par leurs caractéristiques chromatographiques.

Quant à la mitochondrocupréine hépatique néonatale, son existence a été évoquée par l'équipe de PORTER pour expliquer la très forte concentration en cuivre du foie du nouveau-né. En effet, cette fraction mitochondriale contient environ 3 % de cuivre. Elle constituerait la forme de stockage d'attente dans le foie immature précédant en cela l'hépatocupréine qui semble fonctionner comme protéine de stockage chez l'adulte. Assez labile, son cuivre réagit directement avec le diéthylthiocarbamate et peut libérer le métal nécessaire à la céruléoplasmine en voie de synthèse.

2° Enzymes à cuivre.

Bien que représentant un très faible pourcentage du cuivre tissulaire, les enzymes à cuivre constituent néanmoins la forme active essentielle du métal, celle qui, dans l'état actuel de nos connaissances, justifie l'individualisation du cuivre biochimique.

De l'inventaire des enzymes spécifiques à cuivre ou des enzymes dont l'activité est favorisée par le cuivre, mais sans spécificité affirmée, il ressort que tous les enzymes connus exercent leur activité dans les processus d'oxydo-réduction. L'homogénéité de ce groupe de métalloprotéine peut, en effet, admettre comme critère le potentiel d'oxydo-réduction du système $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{++}$, potentiel fourni par la relation :

$$E = 0,15 \text{ v} + 0,058 \log \frac{(\text{Cu}^{2+})}{(\text{Cu}^+)}$$

où 0,15 v représente le potentiel normal. Le fait que ce système se situe dans une position intermédiaire dans l'échelle des potentiels red-ox rend compte de la facile réversibilité de la création $\text{Cu}^{2+} + e \rightleftharpoons \text{Cu}^+$ et d'un rôle aussi aisé de donneur que d'accepter d'électrons.

La mise en œuvre de techniques chimiques comme celles faisant appel à l'activité chélatrice de certaines molécules telles la cuproïne, spécifique de Cu^+ (39), ou la cuprizone, spécifique de Cu^{2+} (40), de techniques physiques telles la résonance paramagnétique électronique et la spectroscopie d'absorption, a permis de mettre en évidence l'équilibre entre les deux degrés d'oxydation du cuivre dans certains systèmes enzymatiques isolés. Ces techniques présentent l'avantage de ne pas être destructrices.

Grâce à elles, d'importantes études ont pu être faites, ces dernières années, sur le rôle du cuivre dans quelques systèmes de première importance. Parmi ceux-ci, interviennent notamment la cytochrome c oxydase, l'ascorbate oxydase et les polyphénol oxydases (telles la tyrosinase), et d'une certaine façon la dopa β hydroxylase. D'autres études plus embryonnaires semblent annoncer que les activités de l'uricase, de la glutathion oxydase, de la butyryl oxydase coenzyme A deshydrogénase (41) soient exaltées par la présence de cuivre. Mentionnons aussi les laccases végétales qui, par leur abondance, forment un matériau d'étude de choix.

Les travaux de WILLIAMS (42) sur le comportement de l'ion métallique dans les transferts de charges au sein de systèmes minéraux fournissent un bon modèle de recherche que l'auteur applique d'ailleurs lui-même à un certain nombre de complexes organiques et biologiques.

Il envisage deux types de transfert de charges entre les éléments d'un couple d'atomes donneur et accepteur d'électrons, selon que l'échange s'opère de molécule à molécule ou à l'intérieur d'une même molécule si celle-ci possède à la fois l'accepteur et le donneur de charges.

Les méthodes d'étude utilisées mettent à profit trois propriétés essentielles des systèmes où plusieurs atomes sont susceptibles d'échange mutuel de charges :

- position des bandes d'absorption dans des zones de grandes longueurs d'ondes, caractéristique du phénomène de transfert ;
- variations de la conductivité de ces systèmes en solution ;
- photoactivation dont les courbes de réponses varient parallèlement avec celles de la conductivité.

L'activation thermique qui augmente la mobilité électronique se traduit également par d'appréciables élévations de la conductivité du milieu où évoluent ces systèmes.

Dans tous les cas, les réponses obtenues témoignent des modifications des niveaux d'énergie des électrons en cause, par absorption de quanta sous excitation lumineuse ou thermique. Par voie de conséquence, la conductivité qui correspond au mouvement de la charge d'un complexe à un autre complexe adjacent, se trouve élevée en même temps que l'état énergétique de l'électron mobilisé.

Ainsi l'aptitude des systèmes à échanger des charges, c'est-à-dire à réaliser des réactions d'oxydo-réduction, sera influencée par les deux considérations suivantes :

- l'échange sera d'autant plus facile que l'électron en cause est plus délocalisé ;
- l'intensité de transfert sera d'autant plus grande que les groupements coordonnés à l'atome de cuivre se montreront meilleurs donneurs de charges.

a) **Cuivre et cytochrome c oxydase.** Il y a trente années, le cuivre était détecté par KEILIN et HARTREE (43) dans des préparations mitochondriales riches en cytochrome c oxydase. Pourtant il fallut attendre les travaux de WAINIO et Coll. (44), en 1959, pour avoir la preuve des relations entre le cuivre de ces préparations et l'activité oxydasique, car le problème de la spécificité du cuivre dans l'activité de l'enzyme a alimenté une longue polémique.

TZAGALOFF et MAC LENNAN (45), en 1965, apportent plusieurs arguments en faveur de cette spécificité. Ils établissent une relation entre la bande d'absorption dans le proche infra-rouge à 830 nanomètres et l'existence d'une liaison cuivre-enzyme.

La séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide d'une préparation de l'enzyme indique qu'il s'agit en fait d'un composé à haut poids moléculaire formé de sub-unités protéiques, dissociables par des détergents, dans lesquelles on peut reconnaître deux groupes :

- une fraction liée à l'hème d'un cytochrome a, d'une part, d'un cytochrome a₃ d'autre part ;
- une fraction à cuivre indépendante de ces derniers, ce qui permet d'imaginer l'unité de cytochrome c oxydase comme une association d'une unité de cytochrome a, et d'une unité de cytochrome a₃ dont les hèmes respectifs seraient liés à un atome de cuivre.

Il est maintenant certain que le cuivre en relation avec l'unité de cytochrome a est sous forme de Cu^{2+} , agissant donc comme capteur d'électrons. La titration ampérométrique met en évidence un transfert de 4 électrons s'effectuant par l'intermédiaire du complexe $(\text{Cu}^+) \text{O}_2$ (46) (47).

La présence dans la famille des cytochromes d'une oxydase à cuivre place cet élément dans une chaîne d'oxydo-réduction qui se manifeste en particulier dans l'érythropoïèse. Certes, l'administration de fer ne corrige pas une anémie par défaut de cuivre ; pourtant l'importance couplée du cuivre et du fer paraît essentielle à une hématopoïèse normale, comme l'ont décrit SCHULTZE et Coll. (48), en 1947.

b) **Cuivre et ascorbate oxydase.** Si de nombreuses discussions ont été soulevées par la présence dans les tissus de mammifères, d'ascorbate oxydase, celle-ci représente effectivement l'un des maillons importants des chaînes d'oxydo-réduction chez un grand nombre de plantes d'où l'enzyme a d'abord été isolée (49).

Elle est, désormais, considérée comme un facteur nécessaire aux processus respiratoires de microorganismes comme certaines *Chlorelles* (50) et de bactéries comme *Aerobacter aerogenes* (51) chez lesquels, d'ailleurs, les formes rugueuses manifestent une meilleure activité que les formes lisses.

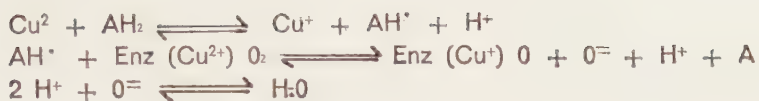
Les travaux de DAWSON (52), étalés sur plus de vingt-cinq années, précisent les rapports entre la présence de cuivre et l'activité enzymatique qui catalyse en milieu aérobie l'oxydation de l'acide L ascorbique.

Extraite de diverses cucurbitacées dont *C. pepo* *condensa*, purifiée par chromatographie sur colonne de D.E.A.E. cellulose ou par électrophorèse sur gel d'amidon, la solution aqueuse de l'enzyme est intensément colorée en bleu. Par ultracentrifugation on attribue au poids moléculaire la valeur de 140 000. Le taux de cuivre est de 0,34 %, dont 75 % sous forme de Cu^{2+} qui représente 6 atomes par molécule, et 25 % sous forme de Cu^+ .

L'activité oxydasique de l'enzyme est liée à la forme d'oxydation maximum du cuivre.

L'apoenzyme libre de cuivre est incolore et inactive. Si ses caractéristiques apparaissent identiques à celles de l'enzyme native à l'ultracentrifugation (53), du moins la répartition en acides aminés de la partie protéique révèle-t-elle la présence de 10 groupements -SH libres par molécule, contrairement à celle de l'enzyme native ou ces groupements ne sont pas libres et semblent avoir pour rôle de maintenir la configuration spatiale de la chaîne polypeptidique propre à orienter les sites actifs à cuivre.

Le mécanisme de la catalyse d'oxydation de la vitamine C, étudié par YAMAZAKI et PIETTE (54), à l'aide de la résonance paramagnétique électronique peut être schématisé de la façon suivante :



Il se formerait un radical libre $\text{AH}^\bullet$ de l'acide ascorbique, intermédiaire induit par l'enzyme à cuivre $\text{Enz (Cu}^{2+})$, laquelle après réduction peut absorber une molécule d'oxygène pour parfaire l'oxydation de la molécule de substrat.

En fait, l'ascorbate oxydase, bien que possédant un substrat spécifique, entre sans doute dans l'ensemble des processus métaboliques d'oxydo-réduction. YAMAZAKI (55) semble vouloir le prouver en observant que cette enzyme est également apte à catalyser la réduction du cytochrome c, en présence d'acide ascorbique et d'oxygène.

c) **Cuivre et polyphénoloxydases.** Les polyphénoloxydases à cuivre peuvent être classées en trois groupes :

- les unes catalysant l'oxydation de fonctions hydroxylées nucléaires de polyphénols végétaux comme les laccases ;
- d'autres admettant à la fois les catéchols (où les - OH sont en position ortho) et les monophénols qu'ils hydroxylent en position ortho avant de les oxyder en quinones correspondantes. C'est le cas de la tyrosinase ;
- le troisième type, représenté par la dopa β hydroxylase dont l'action catalytique s'exerce non plus sur les noyaux, mais sur les chaînes latérales portées par des cycles aromatiques à 2 fonctions phénol toujours en ortho.

L'homogénéité de ces enzymes tient à la présence systématique du cuivre comme cofacteur, de même qu'à la nature polyphénolique des substrats respectifs.

Le premier groupe est représenté par les laccases végétales, dont le processus d'activité est comparable à celui d'autres polyphénoloxydases comme le montre LEVINE (56).

La tyrosinase est l'enzyme la plus caractéristique du second groupe. KUBAWITZ, en 1939 (57), provoque la disparition de l'activité par enlèvement du cuivre et sa réapparition par récupération du cation.

En présence de l'enzyme, les monophénols sont hydroxylés en diphénols ; les catéchols qui en résultent sont déshydrogénés. Les relations entre l'activité de l'hydroxylase et celle de la déshydrogénase restent encore inconnues, bien que BROOK et DAWSON (58) affirment que chacune doit être rapportée à des sites actifs spécifiques bien que localisés dans la même molécule.

MASON (59) représente la réaction générale enzymatique sous la forme de la séquence suivante (tableau I).

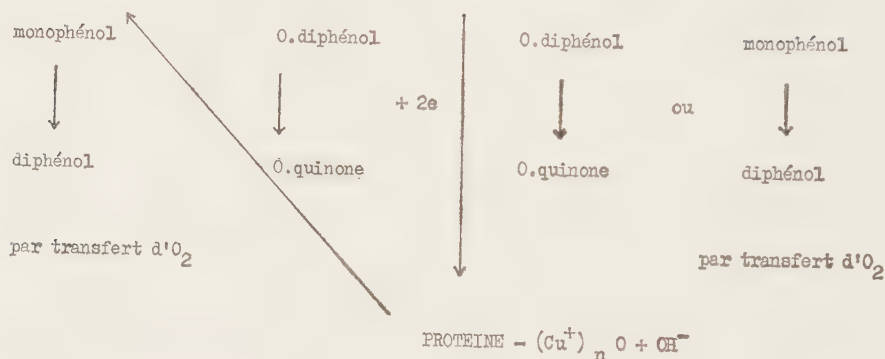
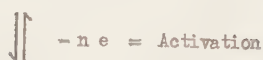


TABLEAU I

Mécanisme d'activité de la tyrosinase. (D'après MASON.)

La forme active du cuivre est donc celle de moindre oxydation.

L'oxydation des deux fonctions phénols est sans doute réalisée en deux temps avec formation intermédiaire d'une semi-quinone.

La tyrosinase catalyse ainsi la libération de deux équivalents réducteurs à partir du substrat.

Le troisième groupe des polyphénoloxydases est représenté par la dopa β hydroxylase qui participe à la synthèse de la nor-adrenaline dans le tissu des médullo-surrénales. Cette enzyme intervient à la fin d'un processus qui implique également l'action de la tyrosinase sous sa forme d'hydroxylase. En effet, la phénylamine est oxydée en tyrosine, puis transformée en catéchol, la dihydroxyphénylamine, par la tyrosine hydroxylase. La D.O.P.A. décarboxylée conduit à la dopamine qui doit être hydroxylée en β du groupement aminé latéral par une enzyme d'hydroxylation qui est précisément la dopa-amine β hydroxylase.

Cette enzyme n'est pas spécifique de la dopamine, mais admet comme substrat de nombreuses phényléthylamines et phénylpropylamines, ce qui laisse à penser que sa fonction biochimique est beaucoup plus générale.

C'est l'étude des inhibiteurs de l'activité de l'enzyme qui a permis la mise en évidence du cuivre comme métalloenzyme. En effet, outre les inhibi-

teurs compétitifs tels les composés de structure analogue à la phényléthylamine (60), les chélateurs métalliques, à cuivre notamment, désactivent aisément la dopa β hydroxylase (61); ainsi en est-il du diéthylthiocarbamate, de l'E.D.T.A., comme de molécules organiques à pouvoir chélateur intense vis-à-vis du cuivre par exemple, à noyau tropolonique comme la colchicine (62).

Deux critères expérimentaux tendent à prouver que le cuivre est dans son état d'oxydation + 2 :

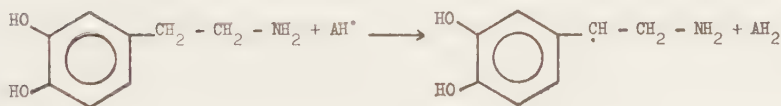
- l'acide ascorbique désactive l'enzyme en provoquant la réduction de Cu^{2+} en Cu^{+} ;
- le spectre de résonance paramagnétique électronique montre l'existence d'un signal intense correspondant à Cu^{2+} (63).

Comme l'ont montré KEVIN et KAUFMAN (64), l'enzyme n'exerce son activité sur les substrats à structure catéchol qu'en présence d'acide ascorbique.

Le mécanisme de la β hydroxylation, d'après GOLDSTEIN (65), serait du type suivant (tableau II).



Complexe radicalaire peroxyde



Introduction d'un radical libre en β
au groupement aminé

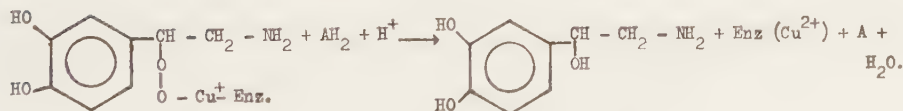
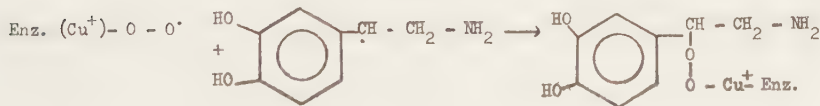


TABLEAU II

MECANISME DE LA β HYDROXYLATION. (D'après GOLDSTEIN.)

On se trouve donc en présence de radicaux libres :

AH•qui induit la formation d'un radical libre en β de la dopamine susceptible de fixer le complexe enzymatique radicalaire peroxyde. Ce composé intermédiaire en présence d'une molécule d'ascorbate, achève son hydroxylation avec régénération de l'enzyme.

L'état d'oxydation + 2 du cuivre est donc nécessaire pour réaliser l'étape préalable à l'oxydation, l'état + 1 n'intervenant que lors de la transformation moléculaire.

Il s'agit donc là d'une enzyme d'un grand intérêt qui préside à la synthèse des catécholamines, enzyme d'ailleurs si facilement inactivable par réduction de son cuivre qu'elle nécessite sa protection in vivo par une peroxydase trouvée par GOLDSTEIN (65) dans les tissus innervés par le système sympathique.

d) Conclusions sur l'importance de la fonction enzymatique du cuivre. Le chapitre du cuivre en enzymologie est loin d'être clos. Ainsi que le suggèrent NARA et YASUNOBU (66), les amino-oxydases elles-mêmes exigeraient le cuivre comme cofacteur d'une protéine liée à une flavine.

C'est dans l'interaction de nombreux processus métaboliques et d'enzymes à cuivre que se situent actuellement les meilleures justifications du rôle biologique de cet élément.

Nous omettrons volontairement de rendre compte des travaux effectués sur les hémocyanines de nombreux invertébrés ; d'une part, ces formes de cuivre ne se retrouvent pas chez les mammifères, d'autre part, d'excellentes revues de l'état actuel de ces problèmes ont été faites, notamment celles publiées par LONTIE et WRITTERS (67) de Louvain et par VANNESTIE et MASON (68) de l'école américaine.

Cette revue nous a semblé nécessaire pour trois principales raisons :

Les méthodes de recherches énoncées sont une voie ouverte à l'étude d'autres oxydases à cuivre comme les catalases, certaines deshydrogénases, les amino-oxydases, qui développeront de plus en plus l'intérêt et l'importance du cuivre en biochimie.

La nature particulière des types de complexes du cuivre envisagé montre que leur désactivation dépend autant de la sensibilité de la molécule protéique dans ses groupements spécifiques, du degré d'oxydation caractéristique du cuivre en tant que centre actif, que de la stabilité du complexe. Spécificité de la molécule et stabilité de la liaison sont étroitement associées.

Ces remarques présentent un intérêt en toxicologie. Elles expliquent notamment la sensibilité du cuivre engagé dans les complexes à l'action de certains agents chélateurs ainsi que la toxicité du métal à l'égard de groupements fonctionnels comme les sulphydrilés.

Les propriétés catalytiques du cuivre sont actuellement reconnues, elles justifient à elles seules la présence du métal sous une forme permanente. On peut se demander toutefois si le cuivre ne possède pas d'autre rôle. N'existe-t-il pas de nombreux cas de variations importantes des taux de cuivre sérique où l'apparition d'un surcroît de métal correspondrait à des

phénomènes biochimiques spécifiques ? Y a-t-il une relation biochimique entre les variations de répartition du cuivre constatées et le phénomène qui les a causées ? Le métal ne s'inclue-t-il pas sous une forme active dans un processus biochimique créé à la demande ? Ou agit-il par une exacerbation de ces propriétés de catalyse enzymatique ?

II. — ASPECTS PATHOLOGIQUES.

L'étude approfondie de certains syndromes pathologiques comme la maladie de Wilson laisse entrevoir une sorte de « toxicité cellulaire » se manifestant par des lésions moléculaires et des troubles convulsifs.

Divers auteurs ont recherché la cause de ces manifestations pathologiques.

Pour l'école anglaise de WALSHE, représentée par PETERS (69), l'ion Cu^{2+} pourrait agir selon deux processus différents :

- soit en bloquant à un certain stade le développement du cycle citrique,
- soit en modifiant le potentiel des membranes mitochondriales.

Dans les deux cas, d'ailleurs, le mode d'action résulterait de l'inhibition de la synthèse de l'A.T.P. Une justification de cette hypothèse est fournie par l'observation d'un parallélisme entre la toxicité du Cu^{2+} et celle, connue, du fluorocitrate. Une preuve expérimentale est apportée par l'emploi de la pénicillamine dans le traitement de la maladie de Wilson pour bloquer l'excès de cuivre tissulaire accumulé.

WALSHE et CUMINGS (70) remarquent, en effet, que l'injection simultanée de Cu^{2+} et de pénicillamine diminue considérablement la toxicité primitive de l'ion métallique. L'étude a été conduite à partir de préparations microsomiales de cerveau de pigeon dont l'activité A.T.Pasique a été évaluée respectivement en absence et en présence de sel cuivrique. La diminution du taux de phosphate observée dans le dernier cas s'avère proportionnelle aux doses de cuivre nécessaires pour provoquer des convulsions chez le pigeon. L'addition préalable, aux mêmes préparations microsomiales, de pénicillamine supprime l'action toxique du cuivre. Par contre, l'administration de thiols à une préparation microsomiale déjà traitée par le cuivre ne fait pas céder les phénomènes toxiques.

Ces observations permettent de penser que l'action du cuivre porterait sur les groupements $-\text{SH}$ de l'A.T. Pase. Confirmation en est donnée sur le plan physiologique par l'impossibilité de faire céder, in vivo, les phénomènes convulsifs par administration de molécules porteuses de $-\text{SH}$ libres. Ainsi, la pénicillamine ne constituerait pas un véritable antidote du cuivre, mais agirait par protection et peut-être par stimulation de l'activité de l'A.T.Pase.

L'étude biologique sur animal que nous nous sommes proposés de réaliser comporte nécessairement l'addition de surcharges cuivriques. Pour rester dans les limites physiologiques et éviter, par une posologie mal contrôlée, l'introduction de causes de toxicité surajoutée, il nous a paru nécessaire de rechercher chez l'animal les formes d'administration du cuivre susceptibles de réaliser de telles surcharges sans provoquer d'accumulation importante.

C'est ce problème que nous avons tenté de résoudre dans le chapitre expérimental consacré à l'assimilation du cuivre chez le Rat.

DEUXIEME PARTIE

QUELQUES ASPECTS DU METABOLISME DU CUIVRE CHEZ LE RAT

I. — CONNAISSANCES ACTUELLES.

Si les biochimistes ont, à plusieurs reprises, tenté d'apprécier l'importance des variations de la répartition du cuivre, c'est encore ici à des affections métaboliques comme la maladie de Wilson et la cirrhose infantile qu'ils se sont adressés (71) (2).

La littérature de ces quinze dernières années ne rapporte, en effet, que quelques publications abordant le problème des modalités d'introduction du cation dans l'organisme physiologique, notamment celui du Rat, grâce à des méthodes de dosage chimique ou physico-chimique utilisant la méthode isotopique au ^{64}Cu ou la polarographie par redissolution anodique.

A) MODALITES CLASSIQUES D'INTRODUCTION DU CATION DANS L'ORGANISME.

Certains auteurs (72) (73) ont surtout cherché à définir la courbe des variations du taux plasmatique en fonction du mode d'administration de sels minéraux, nitrate et sulfate de ^{64}Cu , par voie sous-cutanée, intraveineuse ou orale. Toutefois, ces travaux présentent plutôt un aspect descriptif, sans relation avec les variations concomitantes dans d'autres secteurs, comme les organes et ne permettent pas d'éclairer la destinée du cuivre dans sa migration à travers les différents secteurs de l'organisme, ainsi que la régulation de son taux à l'intérieur des compartiments physiologiques où il se fixe.

D'autres auteurs (74), pressentant l'intérêt d'une étude dynamique du cuivre, cherchent à définir sur l'animal les conditions les plus propices pour étudier l'assimilation du cuivre. Ils utilisent, à cet effet, des rattes blanches carencées en cuivre durant une vingtaine de jours, auxquelles ils administrent une surcharge alimentaire progressive de cet élément, en vue de suivre, par l'analyse polarographique, l'allure de la courbe de stockage hépatique, et de définir le moment où la fixation dans le foie atteint un équilibre. Les auteurs suggèrent, à la suite de cette expérience, que l'absorption intestinale du cuivre est favorisée par la déplétion préalable obtenue par carence.

Cependant une telle étude est criticable, car l'expérimentation se trouve conduite sur des animaux dans un état non physiologique.

B) FACTEURS INFLUENÇANT L'ASSIMILATION DIGESTIVE DU CUIVRE.

Les travaux les plus fructueux concernent le rôle respectivement activateur ou inhibiteur de certains oligoéléments comme le manganèse et le molybdène sur l'assimilation digestive du cuivre.

GUBLER et Coll. (75), en 1954, tentent de définir l'influence du manganèse sur le métabolisme du cuivre. L'administration, à des rats, d'un mélange de sels de manganèse et de cuivre, associés à la ration alimentaire, permet de mettre en évidence une surcharge appréciable de cuivre dans le plasma, le foie, les reins, surcharge environ deux fois plus élevée chez les animaux ayant reçu la même dose de cuivre, à l'exclusion de manganèse.

DICK et BULL (76), en 1956, réalisent un important travail sur le rôle du molybdène dans la nutrition animale. Ces auteurs précisent que l'administration prolongée de molybdène provoque chez les animaux en général une dépression des réserves de cuivre, alors qu'un régime complètement dépourvu de ce métal conduit à une accumulation excessive entraînant une intoxication en tous points semblable à l'intoxication cuivrique. Des investigations plus poussées montrent, en outre, que les déficiences observées dans l'assimilation digestive du cuivre se trouvaient en rapport avec les proportions de molybdène et d'ion sulfate introduites dans la ration alimentaire. De plus, l'addition de manganèse à une ration contenant une dose dépressive de molybdène et de sulfate permet un meilleur rendement de l'assimilation. Cette dernière observation confirme le rôle activateur du manganèse et traduit l'action antagoniste du molybdène et du manganèse sur le métabolisme du cuivre.

Partant de ces données, DICK et BULL prouvent que l'étiologie d'une maladie des ruminants, le « licking sickness » n'est pas dans une déficience en cuivre des pâtures, mais dans l'insuffisance en manganèse. Une preuve directe est apportée par les auteurs qui font céder l'affection par manganothérapie des ruminants.

Le rôle régulateur des oligoéléments sur l'assimilation du cuivre ne s'exerce pas uniquement d'ailleurs au niveau des seuls compartiments : plasma, foie, rein. L'encéphale, par exemple, comme le montre GUBLER (75), qui ne fixe pas de cuivre supplémentaire par administration d'une surcharge, accepte au contraire l'ion cuivrique lorsqu'il est associé au manganèse. Cet élément pourrait ainsi participer aux phénomènes de répartition du cuivre dans différents secteurs, comme à l'opposé molybdène-sulfates accroissent l'élimination urinaire du cuivre.

Le problème des relations des oligoéléments entre eux fait l'objet de travaux actuels. Parmi ces derniers, il faut remarquer la très récente communication de GALLI (77) sur le rôle du molybdène dans la maladie de Wilson.

Malgré leur qualité individuelle, les travaux exposés n'apportent pas cependant une contribution d'ensemble au métabolisme du cuivre. La littérature ne renferme, en particulier, aucune mention de recherches ayant trait à la cinétique de répartition du cuivre simultanément dans le sang et dans les organes.

II. — POSSIBILITES ANALYTIQUES DE DOSAGE DU CUIVRE. CHOIX DE LA METHODE D'ABSORPTION ATOMIQUE.

Le retard apporté au développement des connaissances dans l'étude du cuivre tient au fait que les méthodes analytiques se sont heurtées pendant longtemps à un certain nombre de difficultés.

En effet, le cuivre est normalement présent à des doses très faibles dans les milieux biologiques. Par exemple, chez l'homme, le taux sanguin approche 1 $\mu\text{g/ml}$, les concentrations tissulaires ne dépassent que rarement 3 mg pour 100 g de tissu sec et l'élimination urinaire quotidienne est inférieure à 0,1 mg.

Aux difficultés analytiques s'ajoute encore la faiblesse relative des prises d'essais, notamment chez le Rat où nos études cinétiques n'autorisent pas de prélèvements de sang supérieurs à 0,5 ml.

A ces causes défavorables s'ajoute la complexité des milieux biologiques, riches en protéines, en sels minéraux, en métaux susceptibles de créer des interférences avec l'élément à doser. Enfin, la présence très générale de ce cation en fait un agent de contamination souvent difficile à éliminer des réactifs de dosage.

De nombreuses méthodes de détermination du cuivre en biologie ont été proposées. Une importante étude critique a été faite par M.L. GIRARD (78) dans un rapport au Symposium d'Absorption Atomique de Prague (août 1967) dont voici l'essentiel :

Les méthodes chimiques mettent à profit la facile chélation du cuivre par de nombreuses molécules organiques. La plupart cependant ne sont utilisables que sur des milieux préalablement déprotéinisés ou minéralisés. Les meilleurs agents conduisant à l'extraction quantitative du cuivre en milieu organique sont les suivants :

- le diéthylldithiocarbamate de sodium préconisé par Delépine, peut être utilisé seul selon la technique de FLEURY et COURTOIS (79) ou en présence d'E.D.T.A., pour éviter les interférences, d'après BERMAN (80) ;
- plus récemment, le pyrrolidine dithiocarbamate d'ammonium a les faveurs des auteurs anglo-saxons (81) (82) ;
- la dithizone et la salicylaldoxime, respectivement proposés par HERMANN et LANG (83), TAKENCHI et Coll. (84), la cuproïne par JEROME et SCHMITT (85), la bis-cyclohexanone par BOHUON (86), réactifs complexants classiques du cuivre.

Cependant, déprotéination, minéralisation sèche ou humide, extraction, sont autant de causes d'erreurs que les méthodes physiques de dosage tendent à éviter.

Les méthodes physiques ont l'avantage de mieux résoudre le problème de la spécificité analytique par rapport aux techniques chimiques.

- la spectrophotométrie par émission préconisée par HERRMANN (87) est d'utilisation restreinte, car peu sensible eu égard aux taux de cuivre généralement faibles rencontrés en biologie ;

- la méthode de dosage du cuivre par activation neutronique qui a permis à OWEN (88) de réaliser les premières recherches dynamiques sur le cuivre nécessite un matériel très spécialisé. En outre, l'activation des échantillons, la courte période du ^{64}Cu (12,8 heures), la séparation chimique de l'élément souvent exigée, la manipulation de l'appareillage sont autant de facteurs limitant l'emploi d'une telle technique ;
- la méthode polarographique, dont la sensibilité est considérablement augmentée par la mise en œuvre de la redissolution anodique, ne peut s'appliquer qu'à des échantillons préalablement minéralisés, et par suite se prête mal à la série.

Le problème qui se posait comme préalable à notre travail consistait dans le choix d'une technique :

- assez spécifique,
- assez sensible pour déterminer un élément réparti en faible quantité,
- assez précise pour déceler des variations de faible amplitude,
- assez rapide et d'une mise en œuvre assez simple pour permettre de multiplier les résultats expérimentaux, malgré la complexité des milieux biologiques.

Cet ensemble de qualités est offert par la spectrophotométrie d'absorption atomique. C'est grâce à cette méthode et à des améliorations importantes dans l'appareillage, réalisées par F. ROUSSELET et M.L. GIRARD (89), (90), que nous avons pu apporter une contribution personnelle à une étude dynamique du cuivre chez le Rat.

A) CHOIX DE LA SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE.

Nous nous contenterons ici de décrire les seuls aspects pratiques de la spectrophotométrie d'absorption atomique en insistant surtout sur les perfectionnements apportés à l'appareillage utilisé, qui ont leur importance pour le dosage d'éléments comme le cuivre et aussi le zinc.

1° Caractéristiques de l'appareillage utilisé.

Un appareil classique de spectrophotométrie de flamme par absorption atomique peut se réduire schématiquement aux éléments suivants :

- une source lumineuse, émettant la raie de résonance correspondant à l'élément à doser ;
- un ensemble nébuliseur-brûleur dans lequel est dispersée la substance à analyser ;
- un monochromateur destiné à ne laisser parvenir à l'élément photosensible que la longueur d'onde choisie ;
- un système de détection du flux lumineux représenté par un photomultiplicateur d'électrons ;
- un système de mesure du courant électrique fourni par l'élément photosensible, complété par un système d'enregistrement indispensable.

L'appareil utilisé au laboratoire est le Perkin-Elmer 303 dont les principaux perfectionnements ont porté essentiellement sur le système d'émission et sur le système générateur d'atomes.

a) Le système d'émission est représenté par une lampe à lumière sélective, où l'élément photoémissif est le métal même qui doit être dosé. Les lampes à cathode creuse externe en laiton construites et décrites par F. ROUSSELET (91), ont permis de réunir les qualités fondamentales suivantes :

- intensité et finesse des radiations, sans élargissement des raies spectrales grâce à un dispositif de refroidissement par air de la cathode externe ;
- stabilité d'émission et absence de fond continu, supérieure à celles des lampes à cathode creuse interne où les phénomènes d'ionisation dus à l'armature sont importants.

Un avantage supplémentaire des cathodes en laiton est de permettre le dosage successif du cuivre et du zinc sur un même prélèvement.

b) La génération d'atomes dans les flammes nécessite des brûleurs dont les caractéristiques ne sont pas sans importance sur l'absorption. Le maximum d'efficacité est obtenu avec des brûleurs refroidis permettant l'emploi de flammes dites « froides » du type air-butane et de supprimer les risques d'obstruction des orifices du brûleur par un nébulisat riche en matières organiques et en sels minéraux.

2° Préparation des échantillons destinés à l'analyse.

Plasma ou sérum : la technique précédemment décrite par GIRARD et ROUSSELET (92) consiste en une simple dilution au 1/10 dans de l'eau bidistillée. Dans ces conditions, l'erreur systématique sur les résultats est inférieure à 5 % ;

Organes : pour nous permettre un travail en série, seul générateur de conclusions objectives, les modalités de mise en solution doivent présenter la triple garantie suivante :

- simplicité et rapidité de mise en œuvre,
- rendement aussi proche que possible de la théorie,
- absence de risques de surcharges accidentelles.

C'est pourquoi nous avons systématiquement écarté la minéralisation par calcination sèche, préconisée par certains auteurs américains (93), la lyophilisation préalable des organes, trop longue pour la série malgré l'avantage qu'elle offre de rester à l'abri des contaminations atmosphériques.

Nous avons tout d'abord réalisé une extraction acide, nitrochlorhydrique, des organes dilacérés (appareils Ultra-Turrax). Mais cette technique qui nécessite trois extractions pour entraîner la totalité du cuivre lié aux protéines reste encore longue. Aussi lui avons-nous préféré, en définitive, une technique plus rapide de digestion nitro-perchlorique (93) évitant une minéralisation qui se produit automatiquement lors du passage des échantillons à travers une flamme.

La technique suivie comporte les phases suivantes :

- détermination des prises d'essais, d'un maximum de 8 g, par pesée d'organes frais ;

- macération, pendant cinq heures, dans 1 ml d'HCl pur et 1 ml de HNO₃ pur. Cette macération, non indispensable, permet cependant d'activer la phase suivante ;
- digestion du produit de macération précédent additionné de 25 ml d'eau bidistillée. Le mélange est porté à ébullition, avec agitation mécanique, jusqu'à passage complet en solution du tissu et apparition de vapeurs nitreuses ;
- dilution de l'extrait acide ainsi obtenu, en fonction de la teneur en cuivre de l'organe, pour la préparation d'une solution-mère qui, après centrifugation, est soumise à des dilutions convenables avant la détermination photométrique.

Urine et matières fécales : l'évaluation du cuivre urinaire peut être obtenue sans dilution préalable de l'urine. Quant aux matières fécales, elles sont traitées comme les organes.

B) VALEUR DE LA METHODE.

1° Problème des interférences.

Les erreurs analytiques dues à des composés minéraux ou organiques sont peu importantes dans le dosage du cuivre, comme l'a montré M.L. GIRARD (78).

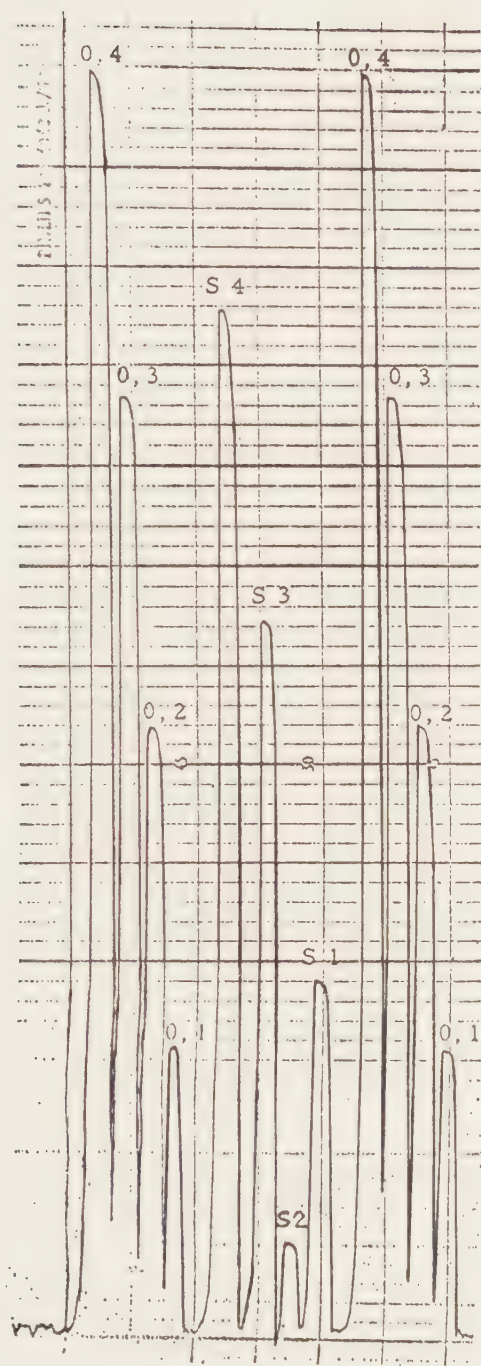
- Parmi les corps minéraux, seuls les sels présents en quantité importantes dans les milieux biologiques pourraient diminuer l'absorption de cuivre. Or, l'addition de 0,1 µg/ml de Cu²⁺ à un soluté artificiel contenant :

Cl ⁻	5,30 g/l	Na ⁺	3,20 g/l	Ca ²⁺	0,100 g/l
PO ₄ ³⁻	0,050 g/l	K ⁺	0,200 g/l	Mg ²⁺	0,020 g/l

ne montre pas, à l'analyse, d'interférence sensible.

- Le pH n'exerce pas non plus d'influence si les brûleurs utilisés sont en acier inoxydable.
- Pour apprécier une éventuelle interférence des protéines sur l'absorption atomique du cuivre, l'auteur utilise des dilutions croissantes d'albumine humaine, auxquelles il ajoute respectivement 1 µg/ml de cuivre sous forme de CuCl₂. Les concentrations retrouvées dépendent du taux de protéines présentes et par suite de la viscosité de la solution nébulisée. Une preuve en est donnée par la comparaison des pourcentages d'absorption en fonction de la dilution en protéines : 97 % dans le cas d'une dilution au 1/10, 93 % seulement dans celui d'une dilution au 1/5.

On conçoit ainsi l'importance de la nébulisation comme aussi du perfectionnement dans l'appareillage qui, dans notre cas, permet de déterminer, avec une précision inférieure à 5 %, 0,1 µg/ml de Cu²⁺, concentration normale rencontrée dans le sérum humain ou le sérum de Rat. Les seules précautions à observer au cours des dosages consistent à vérifier les constantes physiques des prises d'essais, qui doivent rester proches de celles des solutions d'étalonnage.



EXEMPLES DE DOSAGE DIRECT DU CUIVRE DANS LE SÉRUM SANGUIN DILUÉ AU $1/10^{\text{me}}$

Lampe laiton à cathode externe — 6 mA ; $\lambda = 324,7 \text{ nm}$
Gamme d'étalonnage 0,1 — 0,2 — 0,3 — 0,4 $\cdot 10^{-6}$

- S 1 : Sérum normal
- S 2 : Sérum de maladie de Wilson
- S 3 : Sérum de grossesse 6^{me} mois
- S 4 : Sérum de grossesse 8^{me} mois

FIGURE 2

2° Sensibilité.

F. ROUSSELET (89) a défini la sensibilité maximale de la méthode par la notion d'« absorption atomique spécifique ». Dans nos conditions expérimentales (cathode en laiton ; intensité d'excitation : 8 mA ; longueur d'onde : 324,7 nm ; débit de nébulisation : 0,44 ml/mn ; flamme air/butane ; longueur de flamme : 10 cm) l'absorption atomique spécifique du cuivre exprimée en densité optique est de $13,10^{-2}$, valeur assez faible qui souligne l'importance du réglage de l'appareillage, notamment de celui du système de nébulisation.

3° Reproductibilité des mesures.

La **figure 2** rend compte des qualités de reproductibilité de la méthode par le choix d'un exemple de dosage direct du cuivre dans le sérum sanguin dilué au 1/10.

III. — EXPERIMENTATION ANIMALE (*).

Il s'agissait pour nous de définir une posologie convenable du cuivre et d'abord de tester l'efficacité respective des différentes voies d'administration (orale, parentérale, percutanée).

Ce choix effectué, il convenait de rechercher, entre divers types de molécules porteuses de cuivre, le meilleur agent d'introduction du cation dans l'organisme.

En marge du problème pratique à résoudre, nous nous sommes attardés à définir des notions plus générales sur l'influence de la nature des molécules porteuses sur l'absorption intestinale, voie naturelle de pénétration du cuivre dans l'organisme.

A) PRINCIPE.

L'expérimentation sur le Rat est orientée de façon à apprécier le taux de cuivre dans le plasma et dans les tissus hépatique et rénal. D'autres essais d'absorption par voie cutanée nous ont amené à doser également le cuivre dans la peau. Enfin, l'étude de l'excrétion du cuivre a nécessité des déterminations dans l'urine et les matières fécales.

Les dosages du cuivre sont effectués tantôt sur des prélèvements faits au cours du temps en vue d'établir des courbes de cinétique de répartition, tantôt au terme des expériences quand il s'agit d'évaluer l'importance du stockage en fin de traitement.

Les expériences sur le Rat sont effectuées sur des animaux de la souche WISTAR C.F., mâles, âgés de quatorze semaines environ, d'un poids moyen de 350 grammes, nourris avec un aliment cuit U.A.R. Des lots de trois ou quatre animaux à la diète hydrique depuis seize heures sont utilisés.

Ce choix de molécules porteuses de cuivre s'est fixé :

1° Pour la voie sous-cutanée, sur l'acétate de cuivre en solution aqueuse.

2° Pour la voie orale, sur le nitrate, l'acétate, le butyrate, le laurate et le sébaçate du cuivre.

(*) Nous tenons à remercier ici Mlle B. GIRARD qui a activement participé à la réalisation de l'expérimentation animale.

L'administration est faite, à l'aide d'une sonde gastrique, soit en solution aqueuse, soit en suspension au moyen de gomme arabique pour les produits insolubles (concentration : 10 %). Les animaux témoins sont traités avec le seul véhicule.

Afin de suivre l'évolution des concentrations plasmatiques chez le même animal, deux séries de rats sont cathétérisés pour permettre des prélèvements sanguins au cours des vingt-quatre heures.

Chez l'animal anesthésié par voie intrapéritonéale avec 200 milligrammes par kilo d'hexobarbital sodique, un cathéter de téflon (T.T.X. 018, Becton Dickinson) est mis en place dans la veine jugulaire, la veille de l'essai.

3° Pour l'étude de la pénétration du cuivre par voie percutanée, deux pommades sont essayées à base, l'une de sébaçate de cuivre lipophile, l'autre d'un sel minéral, l'acétate de cuivre. Ces deux produits sont inclus dans un gel de propylène glycol. 500 mg de chacune des deux pommades sont appliquées à l'un ou l'autre des deux lots, sur la peau du dos préalablement épilée sous anesthésie locale.

B) JUSTIFICATION DU CHOIX DES ORGANES ETUDIÉS.

Le choix des organes à étudier est justifié par le fait qu'au cours d'évaluation systématique du taux du métal dans des tissus appartenant au foie, au rein, à l'estomac, à la rate ou au cerveau, seuls les tissus hépatique et rénal ont accusé des variations d'amplitude assez grande, même après administration de doses importantes de cuivre pour pouvoir analytiquement être appréciées avec certitude.

Le tableau III réunit les résultats obtenus sur un lot de cinq animaux ayant reçu, par voie parentérale, 0,734 mg de cuivre sous forme d'acétate pendant cinq jours consécutifs.

TABLEAU III

APTITUDE COMPAREE DES ORGANES DE RAT A STOCKER LE CUIVRE APRES SURCHARGE PARENTERALE

ORGANES	TAUX MOYENS DE CUIVRE (mg/100 g de tissu frais)	
	Témoins	Rats traités
FOIE	0,32	11,80
REIN	1,33	5,60
ESTOMAC	0,28	0,26
RATE	0,30	0,28
CERVEAU	0,32	0,32

L'observation des résultats montre donc que, dans les conditions opératoires décrites, estomac, rate et cerveau restent insensibles à la surcharge, alors que foie et rein ont pour le métal une affinité considérable qu'il est d'ailleurs possible de chiffrer.

Le **tableau IV** fait état d'une telle accumulation et de son importance (augmentations respectives de 265 et de 329 %).

TABLEAU IV
POURCENTAGES D'AUGMENTATION DU TAUX DE CUIVRE
DANS LE FOIE ET LE REIN DE RAT, APRES SURCHARGE PARENTERALE

Organes	Poids d'organe frais traité (g)	Taux moyen (valeur absolue) mg/100 g		Surcharge	Pourcentage d'augmentation
		Témoins	Animaux traités		
FOIE	7,100	0,023	0,084	0,061	265
REINS	1,300	0,017	0,073	0,056	329

Le **tableau V** rapporte les concentrations en cuivre mesurées dans le sang, le foie et les reins de cinq animaux soumis à un régime carencé en cuivre pendant trois semaines. Ces diminutions sont de 87 % pour le sang, de 60 % pour le foie et de 70 % pour le rein.

TABLEAU V
RESULTATS D'UNE CARENCE ALIMENTAIRE EN CUIVRE
SUR LE PLASMA, LE FOIE ET LE REIN DE RAT

TISSUS	Taux ingérés (Sang = μ g/100 ml) (Organes = mg/100 g tissu frais)	
	Témoins	Animaux carencés
PLASMA	133,3	46,6
FOIE	0,52	0,21
REINS	1,34	0,40

C) PRELEVEMENTS.

1° Sang.

Chez les rats cathétérisés, destinés à l'étude, en fonction du temps, de la répartition du cuivre dans le plasma lors de l'assimilation digestive, des volumes de 0,5 ml sont prélevés aux temps 0,1/4, 2, 4 1/2, 7 et 24 heures

après le traitement, recueillis sur héparine (5.10^{-2} ml). On a pris soin de rétablir la volémie à sa valeur initiale par injection à l'aide du cathéter de 0,5 ml de soluté isotonique de chlorure de sodium hépariné (50 000 unités pour 100 ml).

Chez les rats non cathétérisés, destinés à l'étude simultanée et comparative des variations plasmatiques et tissulaires lors de l'assimilation digestive, le sang a été prélevé chez l'animal anesthésié au mébubarbital (50 mg/kg voie intrapéritonéale) par ponction à l'aorte abdominale aux temps 0, 1/4, 1, 2, 4 1/2 et 24 heures, celui des animaux utilisés pour l'étude des absorptions percutanée et parentérale, après une semaine.

2° Organes.

Le lobe médian du foie et les reins sont systématiquement prélevés sur les animaux préalablement saignés, puis conservés en évitant toute cause de déshydratation avant le dosage.

Les fractions de peau prélevées sur les animaux destinés à l'étude de la pénétration du cuivre percutanée, sont excisées après lavage à l'aide de sérum physiologique.

3° Urines.

Pour l'étude de l'élimination urinaire les animaux, maintenus par couple dans des cages à métabolisme (*) en acier inoxydable, sont répartis en quatre lots de deux rats chacun :

- 2 lots témoins destinés à l'estimation de l'élimination cuivrique de base ;
- 2 lots de rats traités, l'un par injection sous-cutanée de 5 mg/kg d'acétate de cuivre, dans 0,1 ml de solution aqueuse pour 100 g de poids corporel, l'autre par ingestion de sébaçate de cuivre ($C_{18}H_{35}O_2Cu$) à raison de 50 mg/kg de métal.

L'élimination dans l'urine a été suivie pendant cinq jours consécutifs, à raison d'une période de huit heures et demie par jour répartie en trois temps de prélèvement : trois, six, huit heures et demie, après ingestion par tubage gastrique d'une quantité d'eau égale à 2,5 % du poids corporel de chaque animal, destiné à augmenter la diurèse. Pour assurer la régularité de l'expérience et multiplier les témoins, l'administration des sels de cuivre n'est réalisée qu'au début de la troisième période.

4° Matières fécales.

L'étude de l'élimination fécale de cuivre a été menée simultanément à celle de l'élimination urinaire.

Les fecès sont recueillis vingt-quatre heures avant le traitement, puis deux fois pendant les quarante-huit heures consécutives à ce dernier.

IV. — ASSIMILATION DIGESTIVE DU CUIVRE CHEZ LE RAT.

A) POSITION DES PROBLEMES ET JUSTIFICATION DE L'EXPERIMENTATION.

Au départ, deux problèmes se posent concernant la posologie du cuivre à faire ingérer et le choix des molécules porteuses de cuivre.

(*) CAGE M.S. inox. STIGMA, Paris n° 21 1001.

1° La définition de la posologie entraîne la réponse aux deux questions suivantes :

- Existe-t-il un rapport entre la dose de cuivre administrée et l'importance de l'assimilation ?
- Peut-on définir une valeur maximale pour laquelle les possibilités d'absorption seraient dépassées, qu'il s'agisse d'une saturation éventuelle de mécanismes actifs de la muqueuse digestive ou de seuils plasmatiques suffisamment élevés pour ne plus autoriser de répartition supplémentaire dans les organes ? N'existe-t-il pas une valeur définie par la capacité de fixation du foie, carrefour à partir duquel se réalise la répartition du métal dans l'organisme ?

L'expérimentation consiste à faire ingérer à l'animal des doses croissantes de cuivre, puis de suivre la variation respective des concentrations plasmatiques et hépatiques, à la recherche d'un parallélisme entre les deux cinétiques ou d'une éventuelle dissociation susceptible de préciser le facteur limitant de l'assimilation.

2° Le problème du choix des molécules porteuses de cuivre est à régler expérimentalement en utilisant, pour une même dose de cuivre des molécules à propriétés physico-chimiques différentes, et en recherchant si les courbes d'assimilation et de stockage de cuivre se montrent comparables ou si les taux rencontrés dépendent de la forme administrée.

Pour répondre aux problèmes posés, nous avons choisi d'expérimenter les deux groupes de composés suivants :

- a) des sels hydrosolubles d'acide fort et d'acide faible, tels le nitrate et l'acétate de cuivre, destinés à étudier l'influence de la solubilité et du degré d'ionisation sur l'assimilation ;
- b) des sels de cuivre d'acide gras à longueur variable de la chaîne carbonée, donc de liposolubilité différente, tels le butyrate (C_4) à caractère hydrophile encore marqué, et le laurate (C_{12}) essentiellement liposoluble.

B) ANALYSE DES RESULTATS.

1° Analyse des courbes de concentration plasmatique.

a) Le **tableau VI** reproduit les moyennes des concentrations plasmatiques obtenues à partir de lots de quatre rats, après administration de deux doses de cuivre, 72 et 36 mg/kg de poids d'animal, chacune ingérée sous forme de deux sels, nitrate et laurate de cuivre. La dose 36 mg/kg administrée par la voie digestive a été retenue car elle est proportionnelle à celle couramment utilisée par les voies parentérale et percutanée. La dose 72 mg/kg étant dans un rapport simple avec la précédente rend plus facile l'interprétation des résultats. Cette expérience a pour but simultanément de rechercher pour notre étude une dose de cuivre efficace, voire un éventuel effet toxique, et de déceler, à l'aide de deux sels à propriétés physico-chimiques opposées, l'importance de la nature de l'anion.

TABLEAU VI

CINETIQUE DES TAUX DE CUIVRE PLASMATIQUE
EN FONCTION DE LA DOSE INGEREE

Lots	Nitrate de cuivre (moyenne en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$)		Temps (h)	Lots	Laurate de cuivre (moyenne en $\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	
	72 mg/kg	36 mg/kg			72 mg/kg	36 mg/kg
1 - 1'	246	246	0	7 - 7'	272	272
2 - 2'	880	340	1/4	8 - 8'	262	271
3 - 3'	465	294	2	9 - 9'	557	181
4 - 4'	248	249	4 1/2	10 - 10'	553	220
5 - 5'	249	225	7	11 - 11'	580	202
6 - 6'	270	214	24	12 - 12'	350	218

Les courbes de la **figure 3** visualisent plus clairement les variations observées.

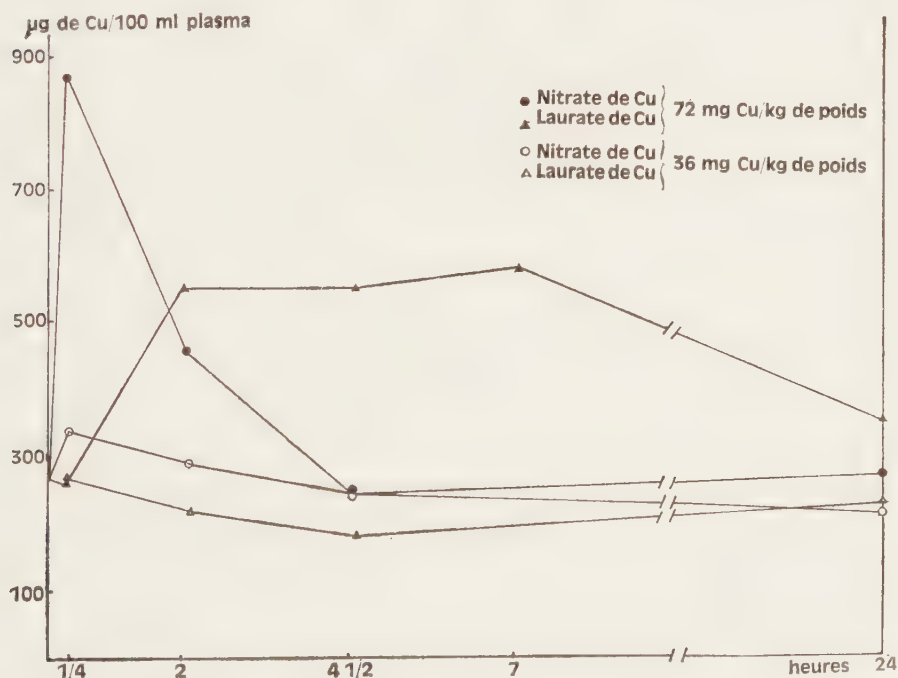


FIG. 3. — VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DE CUIVRE PLASMATIQUE
EN FONCTION DE LA DOSE INGEREE

Temps zéro.

Ce n'est pas sans surprise qu'on constate que tous les animaux cathétérisés, appartenant aux quatre séries traitées, présentent avant l'administration des sels de cuivre, le lendemain de la pose des cathéter, des niveaux plasmatiques nettement supérieurs à la normale. Celle-ci, selon notre propre expérience, est de $130 \pm 15 \mu\text{g}$ pour 100 ml de plasma, alors que, par exemple, les témoins nitrate accusent $246 \mu\text{g}$ et les témoins laurate $272 \mu\text{g} \%$, c'est-à-dire une moyenne de $259 \mu\text{g} \%$ largement supérieure à la normale. C'est là un phénomène qui dépend des conditions expérimentales de traitement des animaux cathétérisés dont nous verrons plus loin la signification.

Temps quinze minutes.

- **dose 72 mg/kg.** Les résultats des dosages plasmatiques se montrent très différents dans les deux cas, puisqu'on atteint d'emblée une valeur maximale égale environ à trois fois celle du temps zéro pour les animaux traités par le nitrate de cuivre, alors que les plasmas soumis au laurate ne présentent pratiquement pas encore de variation.
- **dose 36 mg/kg.** A cette dose, le nitrate provoque une flèche environ trois fois moins élevée qu'à dose double, le laurate ici encore ne causant pas de dénivellation appréciable.

Temps deux heures :

- **dose 72 mg/kg.** L'acmé de la courbe du nitrate a diminué environ des deux tiers, tandis que, dans le cas du laurate, elle est devenue environ le double de la valeur initiale.
- **dose 36 mg/kg.** La pente de décours fournie par chacune des deux molécule est sensiblement la même. Toutefois, une différence se manifeste quant à la valeur du rapport des concentrations nitrate $\div$ dose administrée, ici égale à 1,6 et à 3 pour la dose double de 72 mg/kg.

Temps deux heures et demie à quatre heures et demie.

- **dose 72 mg/kg.** Les plasmas du lot traité par le nitrate sont déjà revenus au taux initial de cuivre, qui persistera d'ailleurs jusqu'à vingt-quatre heures. Quant aux plasmas du lot ayant reçu du laurate, ils se maintiennent à leur niveau maximal jusqu'à 7 heures, pour atteindre à la vingt-quatrième heure une valeur très différente de celle du temps zéro.

Notons qu'à la dose administrée trois animaux sont morts : deux traités par le nitrate, l'autre par le laurate, et que ces animaux présentent aux temps précédents les taux plasmatiques les plus élevés, laissant penser à des phénomènes toxiques auxquels participent sans doute aussi bien l'anion que le cation des sels administrés.

- **dose 36 mg/kg.** Les décroissances se poursuivent parallèlement pour les deux sels étudiés, de la deuxième heure à l'heure quatre et demie où les plasmas des animaux traités au nitrate retrouvent leur valeur initiale qu'on constate encore à la vingt-quatrième heure. Les plasmas des rats traités au laurate, par contre, accusent une chute au-dessous

du niveau du temps zéro avant de se situer, à la vingt-quatrième heure, à un niveau supérieur sinon à celui du temps zéro, du moins à celui du temps quatre heures et demie. Ce résultat traduit, à notre sens, une relation entre l'assimilation et les processus d'élimination, dont les conséquences théoriques, nous le verrons, sont apparues intéressantes.

b) Pour étudier l'influence de la nature des sels de cuivre administrés sur l'efficacité de l'assimilation, nous nous sommes adressés à la dose 36 mg/kg, qui nous est apparue comme non toxique, maintenue constante chez tous les animaux, la seule variable est la nature de la molécule porteuse de cuivre, nitrate, acétate, butyrate et laurate de cuivre.

Le **tableau VII** relate les moyennes des concentrations plasmatiques obtenues à partir de lots de trois rats.

TABLEAU VII
CINETIQUE DES TAUX DE CUIVRE PLASMATIQUE
EN FONCTION DE LA NATURE DES MOLECULES INGEREES

LOTS	TEMPS (h)	TAUX PLASMATIQUES ($\mu\text{g}/100$) ml			
		Nitrate	Acétate	Butyrate	Laurate
1-2-3-4-	0	141	157	164	135
5-6-7-8-	1/4	453	222	248	186
9-10-11-12-	1	379	530	218	185
13-14-15-16-	2	220	254	210	206
17-18-19-20-	4 1/2	151	211	188	141
21-22-23-24.	24	202	228	186	184

Les courbes de la **figure 4** imagent ces variations.

Temps zéro.

Le taux de cuivre plasmatique des animaux non cathétérisés puisque sacrifiés à chaque temps de l'expérience, est évalué en déterminant la moyenne des valeurs obtenues à chacun de ces temps. On vérifie que ces valeurs n'ont pas varié d'une façon significative d'un lot à l'autre. Le taux moyen rencontré, 149 mg %, montre que ces animaux se sont bien comportés comme des témoins absolus.

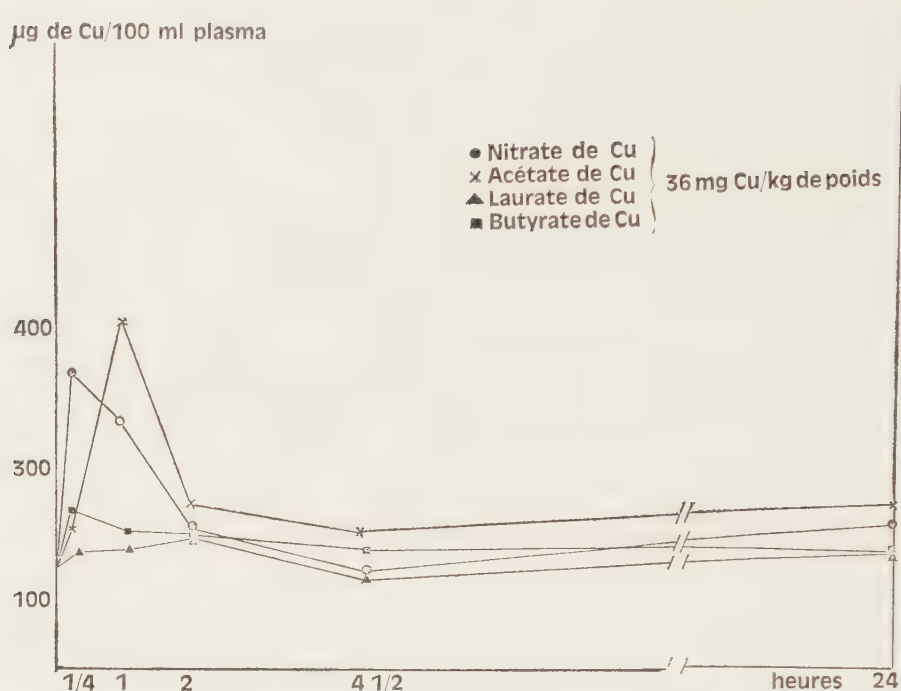


FIG. 4. — VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DE CUIVRE PLASMATIQUE EN FONCTION DE LA NATURE DES MOLECULES PORTEUSES INGEREES

Temps 1/4, 2, 4 1/2, 24 heures :

Nitrate. Le nitrate provoque un pic de concentration au temps quinze minutes suivi d'une décroissance qui, à partir du temps quatre heures et demie, prend une allure exponentielle jusqu'au temps vingt-quatre heures.

Acétate. Ici le maximum est atteint plus tard (temps une heure) que dans le cas du nitrate et dépasse nettement la pointe de ce dernier. Puis, la décroissance est du même type que celle du butyrate.

Butyrate. Comme le nitrate, le butyrate de cuivre fournit un pic significatif après quinze minutes, alors que le laurate ne provoque encore aucune variation apparente. Le butyrate décroît ensuite lentement pour retomber au taux initial vers quatre heures et demie.

Laurate. Ce composé ne provoque que très peu de modifications jusqu'au temps vingt-quatre heures, bien qu'au temps deux heures, la courbe esquisse une variation du même type que celle signalée dans la première expérience.

Notons ici encore qu'au temps vingt-quatre heures les concentrations mesurées indiquent une tendance à un rehaussement des valeurs définies au temps quatre heures et demie.

2° Analyse des variations des taux hépatiques et rénaux.

a) Le **tableau VIII** collecte les résultats des déterminations réalisées sur les organes des animaux après administration de la même dose de cuivre : 36 mg/kg, sous forme de nitrate et de laurate. Ces animaux sont sacrifiés en fin d'expérience (temps vingt-quatre heures).

TABLEAU VIII

**TAUX DE CUIVRE DANS LE FOIE ET LE REIN
24 HEURES APRES INGESTION DE LAURATE ET DE NITRATE = 36 mg/kg**

PRODUITS	FOIE		REINS	
	mg/100 g de tissu frais	Moyenne	mg/100 g de tissu frais	Moyenne
0	0,60 0,60 0,75	0,67	0,93 0,97 0,89	0,93
NITRATE	6,75 7,30 3,90 3,46	5,35	2,66 2,30 1,34 1,57	1,97
LAURATE	4,64 3,98 1,87	3,50	1,73 1,58 1,12	1,48

La seule comparaison possible a été faite avec des animaux témoins cathétérisés au même temps et dans les mêmes conditions que les échantillons d'expérience.

α Foie.

Témoins. Les témoins fournissent un taux de cuivre de 0,67 mg pour 100 grammes de tissu frais, très voisin de la moyenne des taux normaux déterminée par ailleurs et située entre 0,52 et 0,65 mg %

Nitrate. La moyenne obtenue chez les animaux traités par le nitrate de cuivre est de 5,35 mg %, donc environ dix fois plus élevée qu'au temps zéro.

Laurate. La moyenne rencontrée chez les animaux traités par le laurate égale 3,50 mg %, soit environ cinq fois la valeur trouvée au temps zéro.

β Reins.

Témoins : 0,93 mg %.

Nitrate : 1,97 mg %.

Laurate : 1,48 mg %.

Le calcul du rapport cuivre hépatique/cuivre rénal fournit pour chacun des deux lots des valeurs sensiblement égales : 2,7 et 2,5.

b) La figure 5, tracée à l'aide des moyennes des taux hépatiques relevées aux différents temps de l'expérience et collectées dans le **tableau IX** permet de comparer le comportement de chacune des quatre molécules différentes ingérées à la dose de 36 mg de cuivre par kilo d'animal.

TABLEAU IX
VARIATIONS HEPATIQUES DU CUIVRE
EN FONCTION DE LA NATURE DES MOLECULES INGEREES

LOTS	TEMPS (h)	TAUX HEPATIQUES (mg/100 g tissu frais) (valeurs moyennes)				
		Témoins	Nitrate	Acétate	Butyrate	Laurate
1-2-3-4-5-	0	0,55				
6-7-8-9-10-	1/4	0,55	0,99	0,83	0,75	0,84
11-12-13-14-15-	1	0,49	1,26	0,86	1,38	0,87
16-17-18-19-20-	2	0,67	1,30	1,31	1,36	1,18
21-22-23-24-25-	4 1/2	0,50	1,60	1,95	1,88	0,97
26-27-28-29-30.	24	0,63	5,84	8,45	7,94	3,50

Témoins. Les niveaux témoins, égaux à 0,57 mg/100 g, fournissent ici des valeurs comparables à celles des témoins absolus.

Nitrate. Les animaux soumis au nitrate présentent une variation de type exponentiel jusqu'au temps quatre heures et demie, heure à laquelle le taux moyen atteint 1,60 mg %, soit environ trois fois la valeur initiale. La croissance paraît ensuite linéaire jusqu'à la vingt-quatrième heure, temps où le taux de cuivre révélé est environ dix fois supérieur au temps initial.

Acétate. Les animaux traités par l'acétate ne présentent pas la phase exponentielle précédente, mais un type de croissance linéaire qui permet de différencier deux pentes de valeur inégale, l'une se terminant à quatre heures et demie, l'autre comprise entre quatre heures et demie et vingt-quatre heures, temps où le rapport $Cu_{t=24\text{ h}}/Cu_{t=0}$ est sensiblement égal à 15.

Butyrate. Ce sel organique se comporte d'une façon analogue au nitrate précédent. En effet, jusqu'à la vingt-quatrième heure, temps après lequel on relève une valeur de 7,94 mg % alors que le rapport $Cu_{t=24\text{ h}}/Cu_{t=0}$ voisin du précédent est de 14.

Laurate. Quant à l'expérience conduite avec le laurate, elle paraît fournir une croissance de type linéaire pendant tout son déroulement. Le rapport $Cu_{t=24\text{ h}}/Cu_{t=0}$ est ici abaissé à 7.

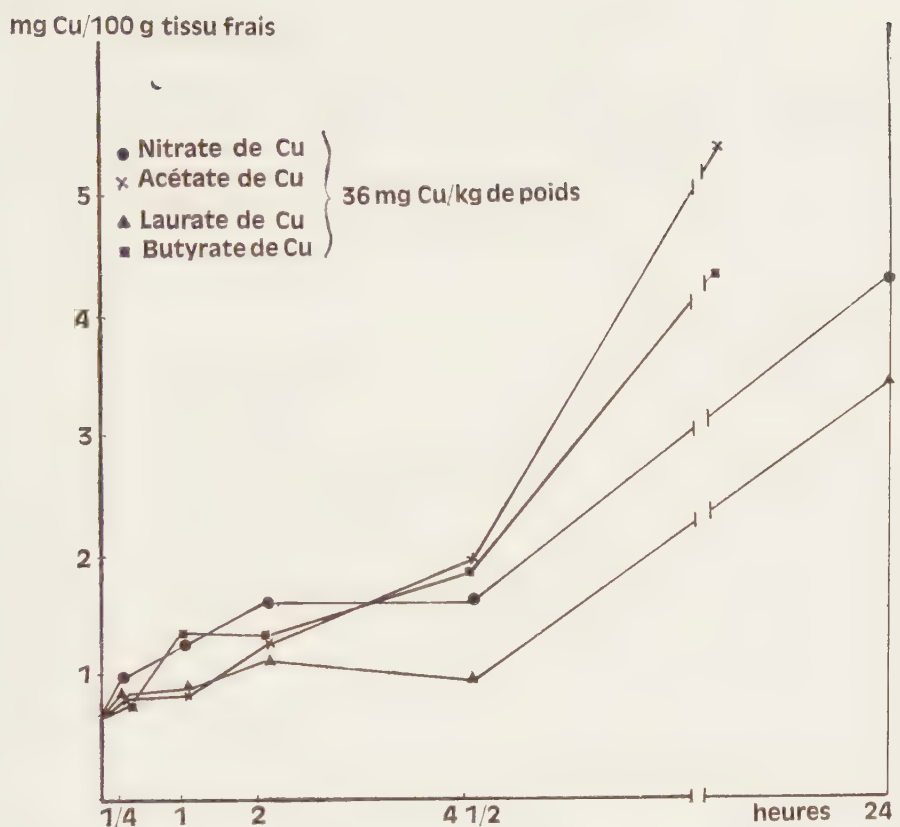


FIG. 5. — VARIATIONS HEPATIQUES DU CUIVRE
EN FONCTION DE LA NATURE DES MOLECULES PORTEUSES INGEREES

TABLEAU X

VARIATIONS RENALES DU CUIVRE
EN FONCTION DE LA NATURE DES MOLECULES INGEREES

LOTS	TEMPS (h)	TAUX RENAU (mg/100 g tissu frais) (valeurs moyennes)				
		Témoins	Nitrate	Acétate	Butyrate	Laurate
1-2-3-4-5-	0	1,62				
6-7-8-9-10-	1/4	1,61	1,84	1,49	1,65	1,52
11-12-13-14-15-	1	1,52	2,36	1,88	1,69	1,89
16-17-18-19-20-	2	1,60	1,83	1,55	1,77	1,61
21-22-23-24-25-	4 1/2	1,59	1,64	2,81	2,75	1,98
26-27-28-29-30.	24	1,60	2,51	3,42	3,55	1,92

c) La **figure 6** permet de suivre l'évolution des variations rénales chez les animaux précédents. Le **tableau X** résume les résultats.

Témoins. Bien que la valeur classique se situe aux environs de 1 mg %, la moyenne des valeurs obtenues chez nos témoins est de 1,57 mg %, taux élevé et surprenant si l'on n'est pas averti de l'amplitude importante des variations du cuivre rénal chez le rat. Cette remarque trouve son intérêt dans la nécessité de multiplier systématiquement les dosages sur animaux témoins chaque fois qu'on désire évaluer des variations rénales sur des animaux traités.

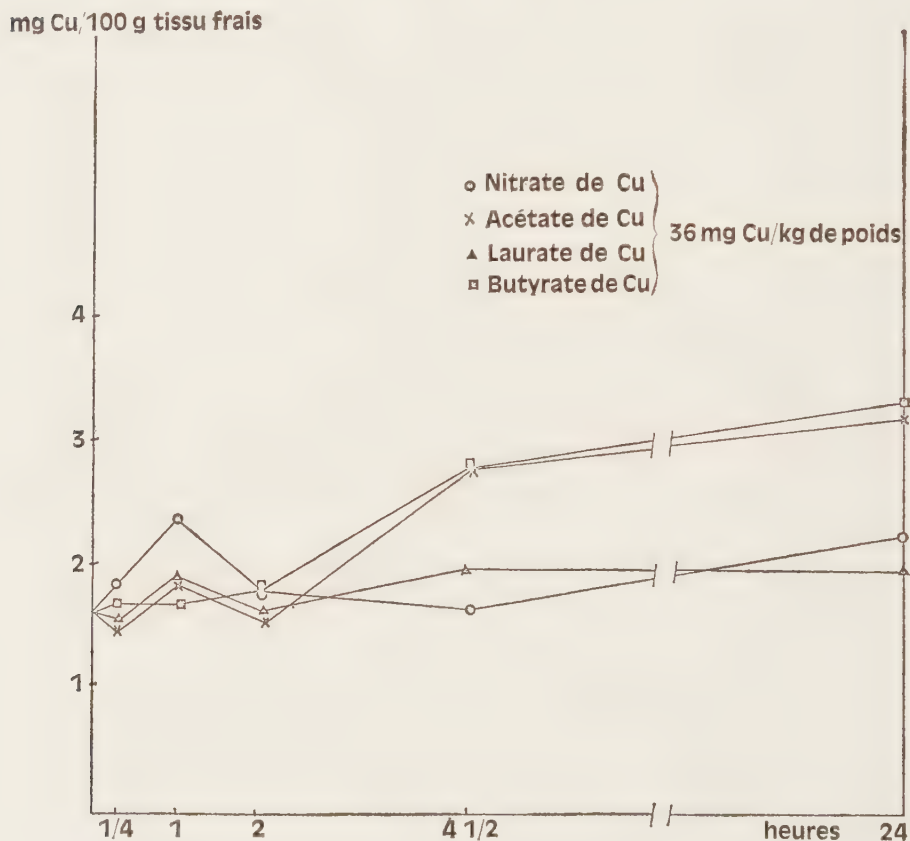


FIG. 6. — VARIATIONS RENALES DU CUIVRE
EN FONCTION DE LA NATURE DES MOLECULES PORTEUSES INGEREES

Temps quinze minutes : les variations ne sont significatives pour aucun des lots.

Temps une heure : les quatre courbes esquissent le même mouvement ; seul un pic paraît significatif, celui fourni par le nitrate à 2,36 mg %.

Temps deux heures : tous les lots reviennent à leur valeur initiale.

Acétate et butyrate se comportent ensuite de la même façon, marquant une augmentation importante jusqu'à quatre heures et demie, puis une croissance plus lente aboutissant, après vingt-quatre heures, à un taux moyen de 3,5 mg. Par contre, le nitrate varie d'une façon moins importante que les précédents, le laurate revenant à une valeur presque identique à celle du temps zéro.

C) INTERPRETATION DES RESULTATS.

L'expérimentation dont nous venons d'analyser les résultats a d'abord pour but de répondre à la double question que nous nous sommes initialement posés :

- l'une intéresse la recherche d'une posologie du cuivre, notion indispensable pour provoquer des surcharges de cuivre destinées à définir les conditions limites d'utilisation du métal à des fins ultérieures d'études théoriques et pratiques ;
- l'autre doit permettre de contribuer à l'élaboration de quelques données fondamentales sur l'influence d'un des facteurs d'assimilation digestive du cuivre, celui concernant la forme d'ingestion du métal.

Notre réflexion sur les résultats de cette expérimentation nous a, de plus, incité à faire quelques remarques intéressant plus précisément le cuivre dans son comportement biochimique dynamique :

- incidence de l'assimilation digestive du métal sur son type de répartition dans deux organes qui, dans nos conditions expérimentales, nous sont apparus les plus sensibles à l'apport de cuivre exogène ;
- rôle de ces organes dans la régulation et le maintien du taux physiologique du métal, notamment du cuivre diététique.

1° Conditions de détermination d'une posologie du cuivre par voie digestive.

Nous nous sommes demandé si le rapport cuivre plasmatique/cuivre ingéré causerait sa proportionnalité dans le plasma selon les doses ingérées lorsque les expériences sont conduites avec des doses variant du simple au double, comme celles que nous avons fixées à 36 et 72 mg/kg.

La première expérience montre qu'avec le nitrate, le rapport de 2, entre les résultats fournis par la dose simple et par la dose double, n'existe que pendant un temps court (entre une heure et deux heures). En effet, le maximum de concentration trouvé avec ce sel est d'abord trois fois moins élevé pour l'essai à 36 mg que pour celui à 72 mg. Le rapport décroît ensuite rapidement puisque après deux heures, il égale 1,6 et s'abaisse après quatre heures et demie pour se situer vers l'unité à la vingt-quatrième heure.

Par contre, le comportement du laurate est tout autre : en effet, le rapport idéal est maintenu entre deux heures et sept heures. Ce n'est qu'après la vingt-quatrième heure qu'il s'abaisse jusqu'à 1.

Donc, si le rapport des concentrations plasmatiques est assez proche de celui des doses administrées dans le cas du laurate, il n'en est pas de même quand on s'adresse au nitrate qui est beaucoup plus fortement absorbé, d'emblée, à forte dose qu'à faible dose.

En fait, ces résultats laissent à penser que le rendement d'absorption dépend de la nature des sels administrés beaucoup plus que de la dose ingérée. La valeur du rapport dose ingérée/concentration plasmatique montre que le caractère d'hydro et de liposolubilité semble intervenir d'une façon prédominante. C'est ainsi que le nitrate de cuivre, hydrosoluble, ne se comporte comme le laurate, essentiellement liposoluble, qu'aux faibles concentrations. Cette différence constatée dans le mécanisme de franchissement de la muqueuse intestinale entre les deux sels de cuivre pourrait s'expliquer par les différences d'ionisation : le nitrate de cuivre, très ionisé, franchirait passivement la barrière intestinale, alors que dans le cas du laurate, ce serait le coefficient de partage de l'ion Cu^{2+} entre la molécule porteuse et la muqueuse qui réglerait l'absorption.

Quoiqu'il en soit, cette analyse indique que la question des conditions de détermination d'une posologie du cuivre est indissociable de celle concernant l'étude de l'assimilation en fonction de la nature des molécules à cuivre ingérées.

2° Influence de la nature de la molécule porteuse de cuivre sur l'absorption digestive.

Les considérations précédentes nous ont incité logiquement à étendre cette étude à deux autres sels de cuivre : l'acétate, composé moins ionisé que le nitrate placé à la « charnière » des sels minéraux et des sels organiques, et le butyrate, liposoluble comme le laurate, dont, cependant, le caractère d'hydrosolubilité reste encore marqué.

Nous avons cherché ainsi à réaliser une sorte de gamme de produits, de solubilité décroissante, dont les deux valeurs extrêmes sont représentées par le nitrate parfaitement hydrosoluble et complètement ionisé, et le laurate essentiellement liposoluble dont la constante de dissociation est très affaiblie.

Cette deuxième série d'expérience montre que la courbe d'assimilation suit approximativement celle de la solubilité. Ainsi :

a) **l'acétate** fournit un maximum de concentration plasmatique retardé par rapport à celui du nitrate et plus élevé que ce dernier. Bien que faible, une certaine liposolubilité de l'acétate expliquerait le partage actif entre la molécule et la muqueuse digestive. Cette hypothèse est d'ailleurs étayée par l'observation de la courbe de stockage hépatique. On constate, en effet, que la fixation de cuivre est d'abord plus lente et plus progressive que celle obtenue avec le nitrate, croissant ensuite d'une façon beaucoup plus importante ;

b) **le butyrate** modifie peu le taux plasmatique de cuivre. Par contre, le stockage hépatique, important, est au début d'allure comparable à celui du nitrate, mais après deux heures, il rejoint le rythme de l'acétate. Ce résultat souligne l'intérêt d'une telle molécule qui, dans la gamme des quatre sels de cuivre étudiés, participe à la fois de la vitesse d'absorption du nitrate et de l'importance de l'affinité de l'acétate ;

c) **le laurate** entraîne des variations plasmatiques de cuivre de faible importance. Quant aux variations hépatiques qui débutent seulement à quatre heures et demie, elles témoignent de la lenteur et du faible rendement de l'absorption intestinale tout en présentant les mêmes caractéristiques que la courbe de fixation du nitrate.

Parmi les déterminations systématiques de cuivre tissulaire effectuées en vue de ce travail, celles réalisées sur le rein sont apparues intéressantes à un double titre :

- par la mise en évidence de variations de moindre amplitude que celles du foie, mais suffisamment caractéristiques pour se trouver utilement exploitables ;
- par l'observation, surtout, de modifications, certes corrélatives à celles du foie, mais pas forcément parallèles à ces dernières.

C'est pourquoi, au cours de l'expérimentation, nous avons eu avantage à coupler les dosages de cuivre rénal à ceux du cuivre hépatique.

La comparaison des résultats souligne, encore plus nettement que lors des examens hépatiques, l'importance de la nature des molécules porteuses de cuivre sur les phénomènes d'absorption intestinale et de répartition dans les organes.

Jusqu'au temps deux heures, on observe une répartition rénale maximale dans le cas de la molécule qui cède le plus facilement son atome de cuivre, c'est-à-dire le nitrate. Ce résultat est en parfait accord avec les constatations effectuées sur le plasma et le parenchyme hépatique.

Par contre, **après deux heures**, les courbes se séparent en deux faisceaux groupant respectivement acétate et butyrate, laurate et nitrate.

On observe ainsi qualitativement que le cuivre de l'acétate et du butyrate, bien que plus faiblement et surtout plus lentement absorbé dans les deux premières heures, est capté pendant un temps beaucoup plus long que dans le cas du groupe laurate-nitrate, de sorte que le résultat final inverse les prévisions initiales.

Quantitativement, acétate et butyrate sont mieux assimilés que le nitrate et le laurate, dont les courbes à partir de la deuxième heure montrent que le taux de cuivre absorbé est extrêmement faible.

D'après l'ensemble des courbes, les variations rénales ne sont appréciables que dans le cas où l'élévation du taux de cuivre dans les autres compartiments (compartiment circulant pour le nitrate, compartiment hépatique pour l'acétate et le butyrate) se trouve suffisamment élevée pour ne plus être compensée par une élimination d'importance au moins égale.

Ces remarques conférerait au rein non seulement le rôle classique d'un organe d'élimination, mais aussi celui d'un **relai de stockage** quand les équilibres : assimilation-stockage hépatique-élimination sont rompus au profit de l'assimilation. Nous allons d'ailleurs étayer cette conclusion dans l'étude de l'élimination urinaire, après surcharge en cuivre.

De telles observations présentent un intérêt supplémentaire sur le plan pratique pour la définition d'une posologie du cuivre telle que les mécanismes de régulation ne soient pas dépassés.

Il semble en effet que les meilleures conditions de pénétration du cuivre par voie intestinale chez le Rat soient remplies par le choix d'une molécule du type butyrate :

- tout juste assez dissociée pour partager avec un bon rendement le cation avec la muqueuse digestive ;

- pour les animaux cathétérisés, ce rapport est très peu différent de 1,25 ;
- celui des animaux non cathétérisés, correspondant donc à de véritables témoins absolus, est de 2,9.

Il n'est donc pas douteux que la concentration plasmatique témoin, plus élevée dans le cas des animaux cathétérisés, ait agi comme élément modérateur de l'absorption du cuivre exogène.

Une autre observation a retenu notre attention, lors de la lecture des courbes cinétiques plasmatiques établies lors de la première expérimentation.

On note, en effet, avec la dose 36 mg/kg, une chute des taux plasmatiques d'environ 35 % dans le cas du laurate, au-dessous de la valeur du temps zéro après la quatrième heure, suivie d'une nouvelle augmentation de même importance, à un niveau très voisin du temps zéro jusqu'à la vingt-quatrième heure. Nous voyons là une relation entre l'assimilation et l'amorce des processus d'élimination.

On sait que l'élimination du cuivre se fait d'une façon prépondérante par voie biliaire ; cependant, l'excrétion directe à travers la paroi intestinale, et l'élimination urinaire ne sont pas négligeables. MAHONEY et Coll. (94), en 1955, montrent que, parmi la totalité du cuivre éliminé, environ 80 % l'est par la bile, 14 % par diffusion à travers la muqueuse digestive, 6 % par l'urine.

L'augmentation plasmatique plus ou moins considérable dans les toutes premières heures, traduit un temps de réaction hépatique, au terme duquel la surcharge sanguine activerait une décharge excrétoire destinée à éliminer pendant un certain temps plus de cuivre que l'intestin n'en absorbe.

Ce phénomène sensible pour la dose de 36 mg/kg, caractéristique pour le laurate, est masqué pour la dose de 72 mg/kg. Ceci laisse envisager l'existence d'une réaction de compensation, voire de défense du foie, vis-à-vis d'une surcharge brutale de cuivre. Cette hypothèse est étayée par l'examen comparatif des cinétiques rénale, plasmatique et hépatique jusqu'à quatre heures et demie. Le stockage rénal présente son maximum dans la même heure que celui du plasma, alors que le foie conserve la relative constance de son taux initial de cuivre.

La lente élévation des taux plasmatiques, observée ensuite jusqu'à la vingt-quatrième heure, devenant parallèle aux variations hépatiques, suggère que tout se passe comme si on assistait à une saturation progressive des mécanismes d'élimination, phénomène objectivé par la relative constance des taux rénaux de quatre heures et demie à vingt-quatre heures.

Cette saturation est explicable, si l'on considère les formes sous lesquelles le cuivre est assimilé et excrété. Si l'on admet que le cuivre est absorbé sous forme ionique, celui excrété l'est en grande partie après transformation métabolique, notamment sous forme de complexe céruléoplasmique (95) dans la bile et de complexe oligopeptidique dans l'urine (96).

On conçoit ainsi que, lors d'une surcharge digestive, la fonction de captation soit plus intense que celle d'élimination, car le passage de l'une à l'autre se fait par l'intermédiaire d'une fonction d'intégration du cuivre jouant ici le rôle de facteur limitant vis-à-vis de l'excrétion.

En résumé, l'assimilation digestive du cuivre entraînerait d'abord une réaction d'élimination compensatrice, tendant à régler un équilibre entre enrichissement métallique par absorption et perte par excrétion. Le stockage hépatique proprement dit s'effectuerait seulement après saturation des mécanismes d'élimination, le foie intervenant pour régler la constance du taux circulant de cuivre à des valeurs restant proches du taux physiologique.

V. — COMPARAISON DES MODES D'INTRODUCTION DU CUIVRE DANS L'ORGANISME.

L'étude précédente présente, à notre sens, un double intérêt :

- théorique, en fournissant des renseignements sur la seule voie physiologique d'introduction dans l'organisme ;
- pratique, en révélant les principes essentiels sur lesquels doit se régler une surcharge destinée à la poursuite d'investigations diverses.

A ce dernier point de vue, d'autres voies d'administration sont également susceptibles d'utilisation, notamment la voie parentérale et la voie percutanée.

Il était donc intéressant de comparer celles-ci à la voie digestive.

Si le rendement d'absorption par voie parentérale est par définition de 100 %, celui obtenu par l'administration percutanée dépend sans doute de nombreux facteurs dont le plus important réside dans la nature des molécules de cuivre appliquées.

C'est ce point particulier que nous tentons d'éclaircir par l'étude suivante :

A) VOIE SOUS-CUTANÉE.

1° Variations sanguines.

L'étude cinétique des taux sanguins, après administration parentérale au Rat de cuivre radioactif sous forme de sulfate, a été faite par SCHUBERT et RIEZLER (73) dont la **figure 7** rapporte les principaux résultats.

Les expériences indiquent que l'augmentation du taux sanguin se fait après un court temps de latence. Elle est maximale dès le début, diminue ensuite rapidement à une valeur qui restera presque constante jusqu'à la trentième minute, terme de l'expérience.

On peut concevoir que la résorption du cuivre ainsi administré est très étalée dans le temps, car les pourcentages de radioactivité calculés restent faibles en comparaison de la dose administrée.

Ces résultats sont mis en parallèle avec ceux obtenus après injection de la même quantité de cuivre, par voie intraveineuse, cette fois. Ici, une flèche de concentration maximale représente environ 60 % de la dose injectée, après une minute, tandis qu'à la trentième minute la presque totalité du cuivre radioactif a disparu du sang.

2° Variations dans le foie et le rein.

Les auteurs des travaux précédents n'ont pas effectué de déterminations simultanées dans les organes. Notre expérience personnelle (**tableau IV**) montre qu'après cinq jours de traitement quotidien de 0,734 mg de cuivre

sous forme d'acétate, administré par voie sous-cutanée, les taux rencontrés dans le foie et dans le rein augmentent respectivement de 265 et de 329 % par rapport aux valeurs normales. La dose de 0,734 mg injectée pendant cinq jours consécutifs correspond au 1/10 environ de la valeur 36 mg/kg ingérée lors des expériences mettant à profit la voie digestive.

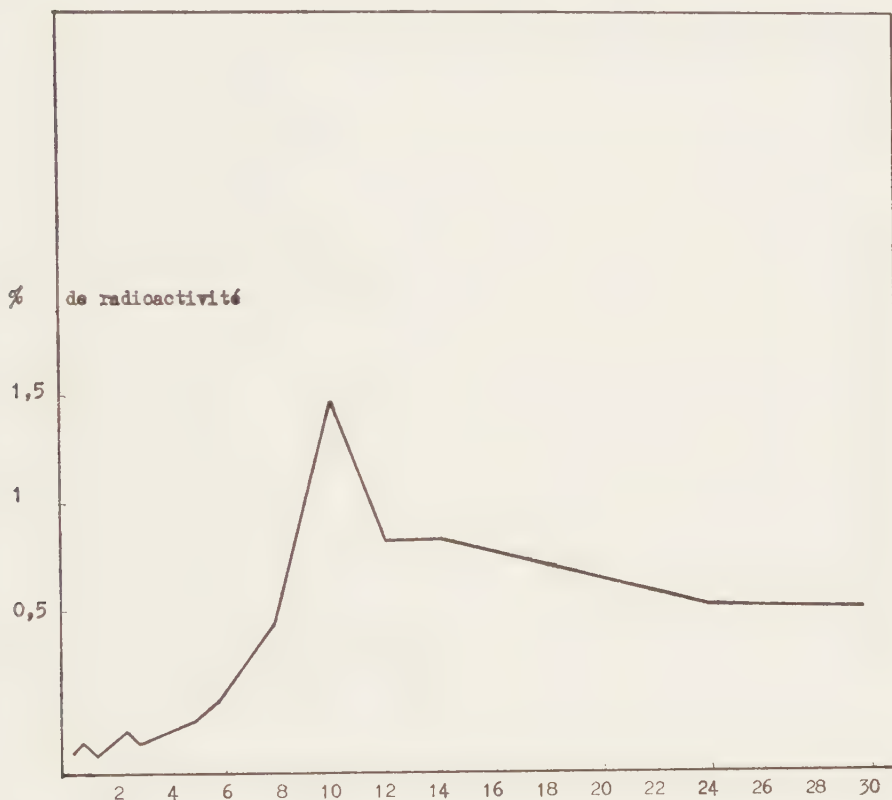


FIG. 7. — VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DE CUIVRE SANGUIN EN FONCTION DU TEMPS APRES ADMINISTRATION DE SULFATE DE ^{64}Cu PAR VOIE SOUS-CUTANEE.

(D'après SCHUBERT et RIEZLER.)

B) VOIE PERCUTANEE.

L'étude a été conduite sur trois lots de chacun trois rats :

- un premier lot d'animaux témoins, les deux autres traités par une pommade, l'un au nitrate, l'autre au sébaçate de cuivre, renfermant la même quantité de cuivre (5 mg %).

La moyenne des taux mesurés dans le plasma, le foie et le rein est rapportée dans le **tableau XI**.

seulement de l'efficacité de la voie percutanée, mais aussi de la durée de son action, puisque les prélèvements ont été effectués une semaine après la mise en œuvre du traitement. Le maintien de telles concentrations sanguines laisse à penser que les effets de ce mode d'administration sont très analogues à ceux de la perfusion continue plus ou moins rapide selon le choix du nitrate ou du sébaçate.

L'observation des taux de cuivre mesurés dans les organes révèle encore mieux l'influence de la nature du sel administré sur l'importance de l'absorption du cation par voie percutanée.

Nous avons à dessein utilisé le même excipient pour inclure chacun des deux sels essayés afin que la seule variable réside dans la nature des molécules appliquées :

- le nitrate de cuivre, ionisable dans le tissu cutané, fournit des concentrations tissulaires particulièrement élevées. Ce phénomène est important à noter car il témoigne d'une différence fondamentale entre voie percutanée et voie digestive. En effet, si le rendement d'absorption, au niveau intestinal, dépend beaucoup de la nature du sel ingéré, il est également fonction, comme nous l'avons discuté, de plusieurs paramètres physiologiques intervenant pour régler activement l'assimilation. Il n'en est pas de même ici où l'absorption est passive, son rendement étant essentiellement lié à la notion de coefficient de partage du cuivre ;
- l'ionisation du sel de cuivre constitue le facteur dominant. Les observations des taux tissulaires, après administration de sébaçate liposoluble et très peu ionisé, indique une absorption notablement moins importante.

Le type d'activité de chacune des deux méthodes est d'ailleurs reflété par les taux de cuivre rencontrés dans la peau des animaux traités. On remarque notamment avec le sébaçate de cuivre des valeurs beaucoup plus fortes qu'avec le nitrate. Ce phénomène traduit la liposolubilité du premier composé, non son efficacité.

Ces propriétés constituent l'intérêt d'une molécule du type sébaçate. Elles peuvent être mises à profit dans les cas où il est opportun de fournir à l'organisme du cuivre en quantité modérée et d'une façon continue.

VI. — ELIMINATION URINAIRE ET FECALE DU CUIVRE CHEZ LE RAT APRES SURCHARGE.

Cette étude est destinée à confirmer l'interprétation des conclusions théoriques qui ont été développées plus haut. Elle vise en particulier à lever l'incertitude sur le rôle du rein lors des surcharges en cuivre administrées par voies orale et parentérale.

L'incertitude provient du fait que les variations du taux de cuivre rénal, généralement corrélatives aux variations hépatiques, ne sont cependant pas toujours proportionnelles à ces dernières. Si, par exemple, la correspondance est bonne avec l'acétate ingéré, c'est le contraire qui se produit avec une molécule du type laurate qui, entraînant une élévation appréciable de la concentration hépatique, ne modifie pratiquement pas le niveau du cuivre dans le rein.

D'une façon plus générale, si le stockage hépatique est toujours témoin de l'absorption cuivrique, les variations rénales doivent, à priori, refléter l'intensité du phénomène d'élimination. Or, la question se pose de savoir si, à la forte modification rénale consécutive à l'ingestion d'acétate, correspond une élimination urinaire accrue et si le taux inchangé de cuivre dans le rein, constaté avec le laurate, témoigne d'une excrétion normale.

L'élimination fécale a été couplée à celle de l'urine pour permettre d'apprécier l'importance de l'excrétion du cuivre par la bile durant l'expérience de surcharge.

A) ANALYSE DES RESULTATS.

1° Elimination urinaire.

Rappelons que l'élimination cuivrique de base, étudiée sur des animaux maintenus pendant l'expérience à la diète hydrique stricte, a été déterminée pendant cinq jours consécutifs à raison d'une période de huit heures et demie après l'administration d'eau. L'élimination urinaire de chacun des deux lots de rats traités, l'un par injection sous-cutanée de 1,25 mg par échantillon de cuivre sous forme d'acétate, l'autre par ingestion d'une dose dix fois plus forte sous forme de sébaçate, a été suivie aux mêmes temps. Ce traitement a été effectué au début de la troisième période.

TABLEAU XII
ELIMINATION URINAIRE DU CUIVRE
EN FONCTION DE LA VOIE D'ADMINISTRATION EMPLOYEE
(SOUS-CUTANEE ET ORALE)

LOTS	PERIODES (durée = 8 h 30)	QUANTITE DE CUIVRE ELIMINEE (en µg)
Témoins de base	1	2,347
	2	3,553
	3	2,920
	4	3,824
	5	3,204
Acétate de cuivre (1,25 mg de Cu) Voie sous-cutanée	1	2,822
	2	3,733
	3	3,676
	4	4,108
	5	4,616
Sébaçate de cuivre (1,25 mg de Cu) Voie orale	1	3,690
	2	3,136
	3	16,054
	4	7,771
	5	8,867

Le **tableau XII** représente la quantité totale de cuivre éliminée dans l'urine par chacun des couples de rats dans les cinq périodes respectives. L'observation des résultats conduit à trois sortes de remarques :

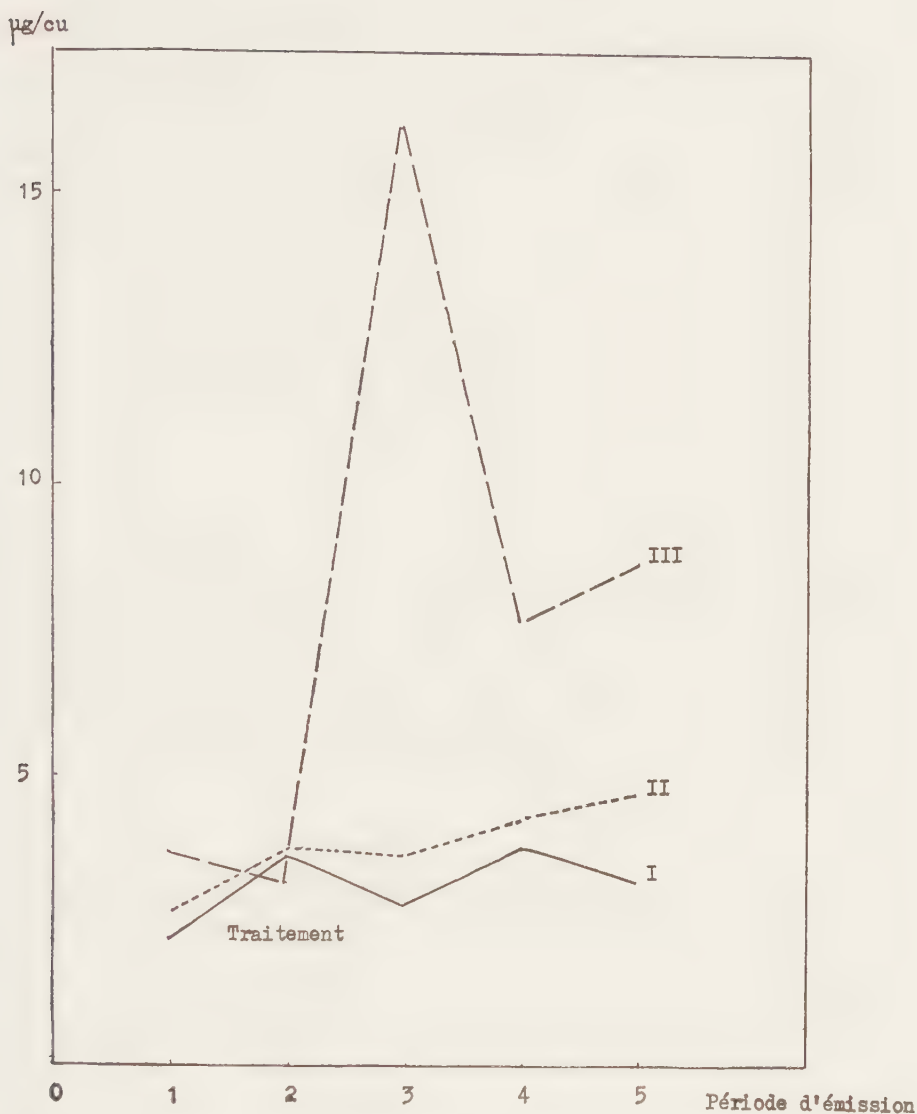


FIG. 8. — VARIATIONS DE L'ELIMINATION URINAIRE DE CUIVRE EN FONCTION DU TEMPS APRES SURCHARGE EN ACETATE DE CUIVRE PAR VOIE SOUS-CUTANEE OU UN SEBASATE DE CUIVRE PAR VOIE ORALE.

a) Les valeurs de l'élimination cuivrique de base sont homogènes ; elles permettent le calcul d'un taux moyen excrété en huit heures et demie qui est égal à 3,170 μg .

Or, les quantités de métal éliminé pendant les deux premières périodes de l'expérience par les lots traités par l'acétate et le sébaçate de cuivre sont respectivement de 3,200 et 3,410 μg /huit heures et demie. Elles sont donc très proches de la valeur témoin.

b) Par contre, les moyennes rencontrées au cours des trois périodes postérieures à l'administration des sels de cuivre sont nettement différentes des moyennes des deux premières périodes. En effet, on obtiendrait une élimination moyenne de 4,133 μ g avec l'acétate, et de 10,900 μ g avec le sébaçate.

c) Quant aux courbes d'élimination, elles varient considérablement l'une de l'autre.

- avec l'acétate, l'élimination urinaire croît avec le temps ; elle ne débute d'ailleurs que vingt-quatre heures après le traitement ;
- avec le sébaçate on atteint l'acmé dès les premières heures après l'ingestion. L'observation des concentrations aux différents temps successifs de la troisième période indique une valeur maximale dans les trois premières heures. Le taux diminue ensuite sans toutefois revenir à la valeur initiale.

La figure 8 souligne les variations observées.

2° Elimination fécale.

L'étude de l'élimination du cuivre fécal a été réalisée sur les mêmes animaux que précédemment. Cependant, l'expérience a été fractionnée ici en trois temps, chacun des prélèvements analysés correspond à l'émission nocturne limitée pour des raisons matérielles à quinze heures et demie.

L'élimination témoin a été évaluée sur le pool des matières fécales des six animaux, prélevées pendant la nuit précédant le traitement, celle après surcharge, sur les matières émises durant les deux nuits consécutives à l'administration des sels de cuivre (tableau XIII).

TABLEAU XIII

ELIMINATION DU CUIVRE
EN FONCTION DE LA VOIE D'ADMISSION EMPLOYEE (SOUS-CUTANEE ET ORALE)

PERIODES D'EMISSION (15 h 30)	ELIMINATION EN MG DE CUIVRE/15 h 30		
	Acétate Cu (Voie sous-cutanée)	Sébaçate Cu (Voie orale)	Témoins
1	0,340	0,430	0,380
2	0,810	4,420	
3	0,670	2,560	

a) On note ici encore une élimination fécale moyenne pour une période de quinze heures et demie et donc égale à 0,350 mg de cuivre.

b) Les variations observées chez les animaux traités par le sébaçate, importantes durant la nuit consécutive à l'ingestion reflètent le processus digestif.

c) Par contre, avec l'acétate par voie sous-cutanée, on constate une élévation significative du taux de cuivre fécal aussitôt après le traitement qui se maintient au bout de quarante-huit heures à un niveau égal encore environ deux fois au taux basal.

La figure 9 illustre cette comparaison.

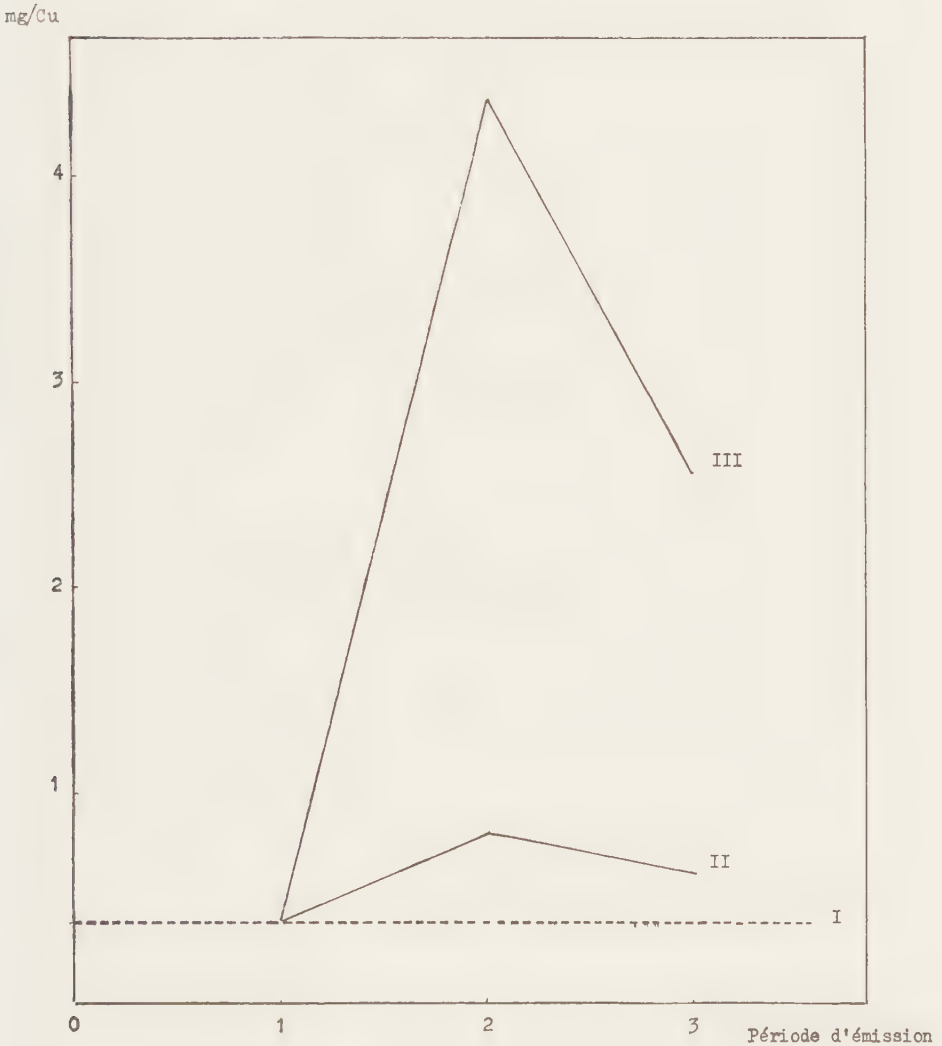


FIG. 9. — VARIATIONS DE L'ELIMINATION FECALE DE CUIVRE EN FONCTION DU TEMPS APRES SURCHARGE EN ACETATE DE CUIVRE PAR VOIE SOUS-CUTANEE OU EN SEBASATE DE CUIVRE PAR VOIE ORALE.

B) INTERPRETATION DES RESULTATS. ROLE DU REIN.

L'analyse précédente permet de répondre à la question initialement posée sur la signification des différences de comportement du rein selon la nature du sel de cuivre administré en surcharge.

La valeur de l'élimination urinaire traduit la réponse rénale à de telles surcharges.

L'administration parentérale d'acétate de cuivre provoque seulement une faible excrétion urinaire, qui n'intervient qu'après un temps de latence, alors que les concentrations tissulaires sont déjà très augmentées.

Par contre, l'élimination intestinale est plus précoce puisque son maximum a lieu dès la mise en œuvre du traitement.

Quant au sébaçate de cuivre dont l'élimination fécale d'un pourcentage important du métal ingéré masque une éventuelle élimination biliaire, il provoque une élimination urinaire considérable, très précoce et qui se poursuit ensuite avec une moindre intensité.

En admettant l'analogie de comportement du sébaçate et du laurate de cuivre, on constate que les concentrations urinaires de cuivre sont très modifiées, alors que le taux rénal du métal reste pratiquement inchangé.

Il est donc possible de conclure que les fonctions rénales d'élimination d'une part et de stockage d'autre part sont dissociées, justifiant ainsi l'hypothèse déjà émise d'un rôle classique d'élimination double d'une fonction de stockage quand l'importance de la surcharge cuivrique dépasse la capacité d'excrétion.

VII. — CONCLUSIONS GENERALES.

Sur la correspondance entre les taux de l'élimination urinaire et les valeurs observées dans le sang et les tissus après surcharges cuivriques selon les différentes voies d'administration étudiées, il est possible de faire plusieurs remarques :

a) Il y a analogie entre les valeurs obtenues avec les sels de cuivre ionisés du type acétate, quelle que soit la voie d'introduction :

- les variations sanguines et tissulaires ont la même allure. Cependant, pour les voies orale et sous-cutanée, l'augmentation du taux de cuivre sanguin s'installe précocement dès les premières heures après l'administration du composé métallique, elle est plus durable quand on s'adresse à la voie percutanée ;
- les modifications tissulaires sont toujours amples. La courbe d'élimination urinaire suggère une rapide saturation des mécanismes d'élimination.

b) L'analyse précédente s'observe aussi avec des sels peu ionisés et liposolubles comme le laurate et le sébaçate de cuivre, administrés par voie orale et percutanée.

Aux variations sanguines très étalées dans le temps, de moindre amplitude qu'avec les sels ionisés, correspondent des modifications moins nettes du taux hépatique et pratiquement négligeables du taux rénal.

c) L'observation d'une élimination urinaire accrue avec les sels ionisés permet de poser deux conclusions :

- la charge cuivrique tissulaire s'avère très importante, augmentant les risques de toxicité, quand la pénétration du cuivre dans l'organisme est rapide ;
- au contraire, l'introduction progressive du cation, assurée par des sels liposolubles et peu dissociés, entraîne des variations hépatiques modérées. De plus, les concentrations plasmatiques restent en deçà de la valeur qui limite la capacité d'élimination du rein, sauvegardant le fonctionnement normal des mécanismes physiologiques de régulation du taux de cuivre dans l'organisme.

Les conclusions précédentes sont déterminantes pour comparer qualitativement l'assimilation du cuivre selon les différentes voies d'administration. Elles suggèrent, pour l'administration de molécules peu dissociées, la supériorité de la voie digestive qui seule provoque l'enrichissement de l'organisme en cuivre. La diversité de comportement du cuivre en fonction de la nature des molécules montre l'importance des études cinétiques que nous avons menées. Celles-ci sont, en effet, indispensables, car elles permettent de définir une posologie qui, tout en augmentant la concentration totale en cuivre de l'organisme, sauvegarde le fonctionnement des mécanismes d'élimination.

Si les résultats de cette étude doivent faire écarter la voie parentérale qui crée une dissémination tissulaire de cuivre importante, la voie percutanée peut également constituer, avec des sels du type sebaçate, un mode d'introduction du cuivre dans l'organisme, dans les cas où un traitement de longue durée est justifié.

L'ensemble des résultats acquis appelle cependant une étude complémentaire, la détermination de la nature des liaisons contractées par le cuivre introduit dans l'organisme avant l'intégration de l'élément métallique dans les systèmes chargés de l'accepter. Le problème d'un « cuivre actif » se pose ainsi que nous avons pensé l'aborder par l'étude des « compartiments métaboliques » du cuivre circulant.

TROISIEME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES COMPARTIMENTS DU CUIVRE CIRCULANT

I. — ORIENTATION DES RECHERCHES.

Nous avons souligné, dans la première partie de ce travail, l'intérêt de préciser les formes de transfert du cuivre circulant pour mieux approfondir le rôle dynamique de cet élément.

L'étude qui va suivre a été conduite en vue de discerner une forme de transport active qui prendrait en charge le cuivre assimilé ou libéré des organes de stockage pour le transférer aux systèmes d'utilisation comme les protéines tissulaires et les enzymes à cuivre. En dehors de ces systèmes classiques, ne convient-il pas, en outre, de se demander si les variations importantes du taux de cuivre sérique, observées dans de nombreux processus physio-pathologiques, ne dépendent pas de systèmes particuliers « créés à la demande » ?

Il est apparu souhaitable de rechercher une méthode d'estimation du bilan du cuivre sérique, qui permettrait simultanément une différenciation et une appréciation quantitative des compartiments révélés.

La notion de compartiments du cuivre circulant a déjà suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs.

Ainsi, l'observation de différences de réactivité du cuivre sérique vis-à-vis du diéthylldithiocarbamate de sodium a conduit CARTWRIGHT et WINTROBE (6) à envisager l'existence de deux principales fractions :

- l'une, prépondérante (environ 93 % du cuivre total) constituerait le **cuivre céruléoplasmique**, ne réagissant avec l'agent complexant qu'après acidification chlorhydrique du sérum ;
- l'autre (environ 7 % du cuivre total), extractible directement en milieu neutre, serait à rapporter au **cuivre albuminique**.

Nous n'avons pas repris la technique adoptée par les auteurs pour les deux raisons suivantes :

- manque de spécificité du réactif de chélation,
- calcul du taux de cuivre céruléoplasmique par différence entre les concentrations du cuivre total et du cuivre albuminique.

Nous n'avons pas, non plus, retenu la délicate et longue technique de SASS KORTSAK (29) destinée plus à une démonstration de l'existence de plusieurs fractions qu'à l'étude systématique de ces dernières.

La méthode récemment publiée de LORBER et Coll. (97) appliquée à l'étude du rapport anormal du cuivre et des protéines sériques dans l'arthrite rhumatoïdale n'a pas non plus retenu notre attention. A l'imprécision sur les résultats du cuivre non céruléoplasmique également obtenus par différence, s'ajoutent les causes d'erreurs inhérentes aux modes de dosage du cuivre céruléoplasmique tenant compte de la concentration en protéine déterminée par voies colorimétrique et immunochimique.

C'est aux propriétés des résines cationiques d'échanger des ions Na^+ ou des ions H^+ avec des ions métalliques comme le cuivre des protéines selon la nature de la phase (Na) ou (H) utilisée que nous nous sommes adressé pour doser directement le cuivre des fractions mises en évidence.

Trois étapes ont jalonné notre travail :

A) Mise au point d'une méthodologie permettant d'apprécier qualitativement l'intensité des forces de liaison des complexes physiologiques du cuivre

- soit en comparant l'action d'une résine en phase (Na) respectivement sur un sérum normal et sur un sérum surchargé en cuivre par des complexes de stabilité diverse,
- soit en sensibilisant les liaisons protéines-cuivre sous l'influence d'une diminution du pH,
- soit, enfin, à l'aide d'une résine cationique utilisée en phase (H) qui nous permettra de décrire une technique de mobilisation progressive et de sélection de plusieurs fractions protéiques, conduisant à la définition de « compartiments du cuivre circulant ».

B) Application de la technique proposée à l'étude du cuivre dans le sérum normal pour dégager les constantes caractéristiques des compartiments mis en évidence.

C) Des résultats obtenus chez l'homme normal, nous essaierons, à la suite d'une étude sommaire des relations entre l'hypercuprémie et divers processus physiopathologiques, de transposer aux sérums à cuprémie anormale une méthode d'investigation, voire de diagnostic différentiel des affections hépatiques, susceptibles d'apporter à la signification du cuivre sérique des éléments de précision qui lui font encore largement défaut .

II. — METHODOLOGIE - UTILISATION DE RESINE EN PHASE (Na).

A) EXPERIENCE INITIALE.

1° Principe.

Le premier essai de ce travail a porté sur la recherche dans le sérum humain d'un cuivre libre ou faiblement lié aux protéines. Pour isoler une fraction correspondant à ce type, nous nous sommes adressé à une résine échangeuse de cations, du type AMBERLITE I.R. (Na) (*). Cette dernière a été mise en contact tantôt avec une solution minérale de composition saline voisine du sérum, pour tester l'activité vis-à-vis du cuivre, tantôt avec un sérum humain entier, simple ou additionné d'une quantité de cuivre égale au taux physiologique.

(*) AMBERLITE résin. I.R. - 120 (Na), Analytical Grade, the British Drug Houses Ltd B.D.H. Laboratory chemicals division Pool England, 736 240.

Des prélèvements ont été effectués après divers temps de contact du milieu étudié avec la résine, puis dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique. Pour chacun des sérums a été établie une courbe de décroissance du taux de cuivre en fonction du temps.

TABLEAU XIV

**ACTIVITE D'UNE RESINE AMBERLITE EN PHASE Na
EN PRESENCE D'UNE SOLUTION AQUEUSE CONTENANT 0,15 $\mu\text{g/ml}$
DE CUIVRE (A) D'UN SERUM HUMAIN NORMAL (B)
ET DE CE MEME SERUM SURCHARGE AVEC 0,15 $\mu\text{g/ml}$ DE CUIVRE (C)**

TEMPS (mn)	TAUX DE CUIVRE ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)		
	A	B	C
0	150	150	308
1	34	148	312
3	12	150	312
5	7	150	306
7	6	152	298

2° Protocole opératoire.

L'expérience comporte les trois étapes suivantes :

a) Dans trois béchers de 100 ml, introduire successivement :

- **Solution A** : 2 ml de solution artificielle (S.A.) + 2 ml d'une solution titrant 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de Cu^{2+} (Cu Cl_2) + 16 ml d'eau bidistillée.
- **Solution B** : 2 ml d'un pool de sérums humains provenant de sujets normaux + 18 ml d'eau bidistillée.
- **Solution C** : 2 ml du pool précédent + 2 ml de solution titrant 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre (Cu Cl_2) + 16 ml d'eau bidistillée.

b) Une partie aliquote de chaque solution est prélevée et analysée pour déterminer le taux de cuivre initial.

c) La résine sèche est ensuite ajoutée au volume restant, en même temps qu'est déclenchée une agitation mécanique qui devra rester uniforme durant toute l'expérience. Simultanément, on détermine par chronométrage des temps arbitrairement fixés à 1, 3, 5, 7 minutes de contact efficace avec la résine ; 3 ml de solution sont chaque fois prélevés en vue des déterminations photométriques du cuivre.

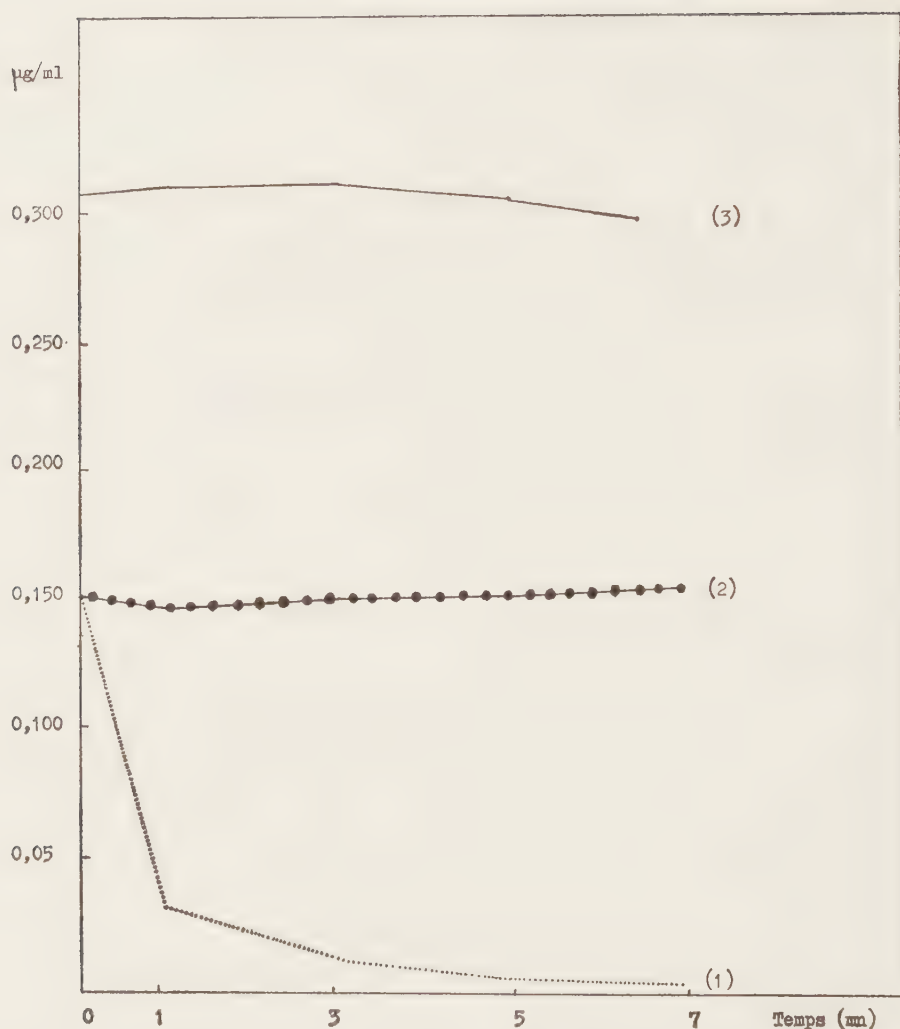


FIG. 10. — COMPARAISON DE L'ACTION D'UNE RESINE EN PHASE (Na) SUR UNE SOLUTION AQUEUSE DE CUIVRE ET SUR UN SERUM (pH 7,5)

- (1) Solution saline titrant 0,15 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre.
- (2) Sérum normal.
- (3) Sérum normal surchargé avec 0,15 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre.

Le **tableau XIV** rapporte les résultats des dosages de cuivre obtenus aux différents temps de l'expérience.

La **Figure 10** compare graphiquement les précédents résultats.

Cette expérience permet de constater l'importance de l'affinité des protéines pour le cuivre. En effet, la solution saline, après trois minutes de

contact, cède à la résine la totalité des ions libres, alors que le sérum, non seulement, ne cède rien à celle-ci, mais peut encore capter une surcharge cuivrique égale à celle qu'il renferme.

Pour confirmer qu'il s'agissait là d'une relation spécifique entre les protéines du sérum et le cuivre ajouté, nous avons surchargé un sérum en chlorure cuivrique et vérifié le parallélisme (figure 11) entre la répartition du cuivre et le diagramme protéique obtenu après filtration sur gel Séphadex : 5 ml d'une solution de chlorure cuivrique, titrant 10 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre, sont ajoutés à 10 ml de sérum, puis la solution est filtrée sur gel Séphadex G. 25. On pratique sur ce dernier une élution à l'aide d'un tampon phosphate 0,02 M, à pH 7. L'analyse protéique est réalisée en continu pendant l'élution.

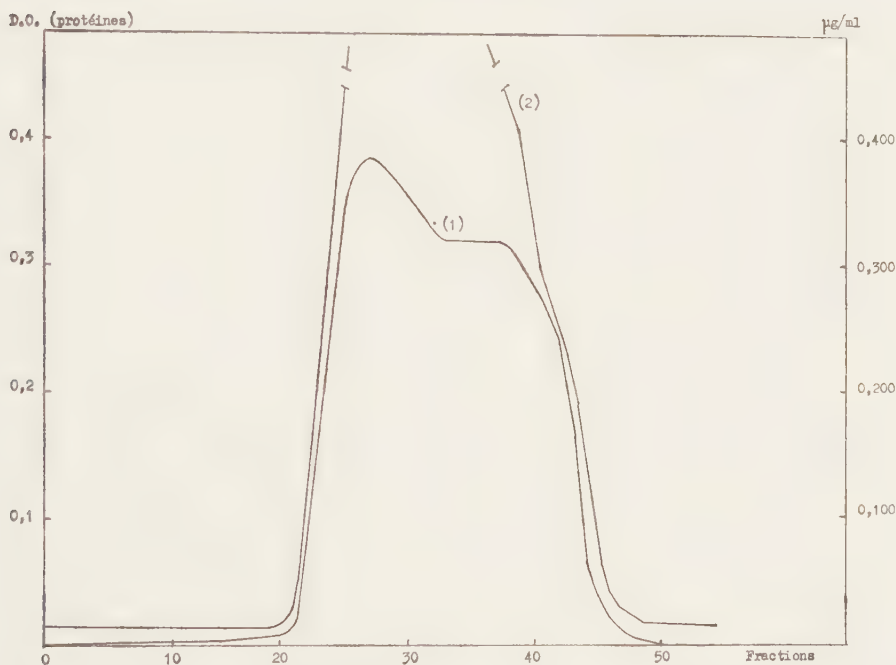


FIG. 11. — SUPERPOSITION DU DIAGRAMME PROTEIQUE ET DE LA COURBE CORRESPONDANTE DES TENEURS EN CUIVRE, APRES ISOLEMENT PAR GEL FILTRATION (1) : PROTEINES ; (2) : TENEURS EN CUIVRE.

B) COMPORTEMENT DE QUELQUES COMPLEXES DU CUIVRE EN PRESENCE D'UN SERUM NORMAL.

1° Principe.

L'affinité des protéines sériques pour le cuivre préalablement complexé dans des molécules diverses est comparée à celle de la résine (Na) pour ce même cuivre préalablement dilué dans la solution minérale.

L'expérience est conduite avec des solutions titrées en cuivre de trois complexes de stabilités différentes :

- **citrate de cuivre** : préparé à partir d'une solution d'acide citrique et d'hydroxyde de cuivre, en quantité stoechiométrique. Le complexe vert pomme est parfaitement stable et le demeure en présence de soude 6 N ;
- **salicylate de cuivre** : obtenu par dissolution de salicylate de sodium dans une solution de sulfate de cuivre. La faible stabilité du complexe vert émeraude est attestée par la précipitation d'hydroxyde de cuivre après addition de soude 1 N ;
- **Hydroxy-cupri-orthoquinoléine-5-sulfonate de triméthylamine** : solution préparée par simple dilution de la solution de « Cuproxane » du commerce.

Chacun de ces complexes a été dilué de façon à fournir des concentrations de 1 à 2 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre.

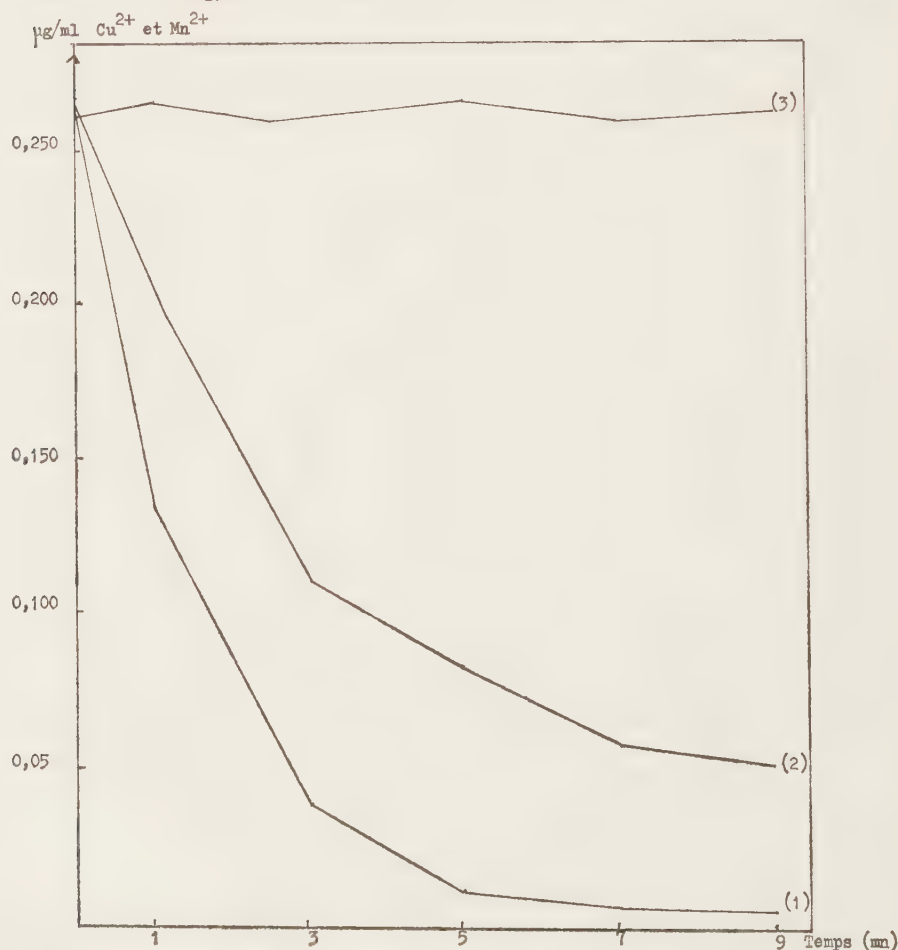


FIG. 12. — ACTIVITE COMPAREE D'UNE RESINE EN PHASE (Na) SUR UN SERUM ARTIFICIEL SURCHARGE AVEC 0,25 $\mu\text{g/ml}$ DE Mn^{2+} (1) ET SUR UN SERUM NORMAL ADDITIONNE DE Mn^{2+} ET Cu^{2+} A PARTIES EGALES (0,25 $\mu\text{g/ml}$) (2 et 3).

2° Résultats et interprétation.

a) Citrate et salicylate de cuivre en solution minérale cèdent la totalité de leur cuivre à la résine en un temps inférieur à trois minutes. Par contre, préalablement mis en contact avec le sérum, les précédents complexes se dissocient au profit des protéines sériques dont l'affinité pour le cuivre est encore suffisante comme en témoigne le graphique représentant les taux de cuivre en fonction du temps et ne manifestant aucune décroissance.

b) Le « Cuproxane » révèle un comportement différent ; sa solution minérale qui, au temps zéro contient 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre, en retient encore 0,08 $\mu\text{g/ml}$ après sept minutes de contact avec la résine. Les deux temps sont séparés par une décroissance linéaire, preuve de la forte stabilité de ce complexe. Dans le cas du sérum surchargé, bien que la décroissance soit peu importante, on constate une différence de 0,025 $\mu\text{g/ml}$ entre le temps zéro et le temps sept minutes. Il est donc possible de considérer que la stabilité du « Cuproxane » représente grossièrement la limite inférieure de celle des complexes les plus labiles du sérum.

Cette expérience a permis de constater la spectaculaire affinité des protéines pour le cuivre. Nous nous sommes demandé si une telle affinité s'affirmait encore avec d'autres cations comme le manganèse, par exemple. Il a été montré au laboratoire, où un travail vient d'être réalisé sur quelques aspects du manganèse en biochimie (98) qu'un sérum traité dans les mêmes conditions libérerait aisément la quasi totalité du métal de sa copule protéique. La **figure 12** reproduit un exemple de résultats obtenus à partir d'un sérum surchargé simultanément en Cu Cl_2 et en Mn SO_4 à concentrations égales.

Cette différence de comportement n'est explicable qu'en accordant à la liaison protéine-cuivre une énergie très supérieure à celle établie avec le manganèse. Cette énergie dérive vraisemblablement de l'aptitude du cuivre à échanger des orbitales moléculaires très stables avec les groupements actifs des protéines.

Ces expériences n'ont cependant pas permis de différencier un cuivre physiologique labile d'un cuivre plus solidement fixé. Il parut nécessaire de chercher à faire varier le pH du milieu, paramètre auquel les charges des protéines sont particulièrement sensibles.

C) SENSIBILITE DES COMPLEXES PHYSIOLOGIQUES DU CUIVRE SERIQUE AUX VARIATIONS DE pH.

1° Principe.

L'ion Cu^{2+} , de caractère acide, semble lié plus sélectivement aux protéines riches en groupements azotés à champ fort, tels que nous les avons définis dans la première partie de ce travail. A priori, les forces de telles liaisons doivent être diminuées en milieu acide, ce que nous allons tenter d'observer par une étude des variations de stabilité des complexes physiologiques en fonction du pH.

Nous avons mis à profit la propriété des échangeurs de cations en phase (Na) de ne provoquer que de faibles modifications acido-basiques du milieu, quand on les oppose à des solutions métalliques de pH voisin de la neutralité ou supérieur à 7.

De telles résines deviennent, par contre, inutilisables pour capter des ions métalliques si le pH des solutions se situe dans la zone franchement acide.

En effet, en milieu neutre ou basique, le schéma de la réaction d'échange est du type :



La résine est donc active vis-à-vis des cations métalliques de la solution, les changements acido-basiques du milieu conduisant à l'alcalinisation proportionnelle à la concentration des ions échangés.

Dans la zone des pH acides, la réaction est différente :



La résine (Na) s'inactive vis-à-vis des ions métalliques, la réaction correspondant à la simple régénération de l'échangeur.

Aussi avons-nous cherché à apprécier, en nous situant entre les limites de pH compatibles avec l'activité de la résine, les valeurs qui provoqueraient une éventuelle dissociation des complexes protéiques du cuivre.

Ceci justifie l'emploi de tampons variés ajoutés au sérum en vue d'amortir les faibles modifications acido-basiques du milieu inhérentes à la nature même de la réaction d'échange. Les expériences ont été menées entre les pH 9 et 5, correspondant à l'activité de la résine en phase (Na).

2° Mode opératoire.

Trois types de tampons ont été essayés :

- pour les pH compris entre 9 et 8 : CO_2HNa/CO_2Na_2 ;
- pour les pH compris entre 7 et 5 : soit un tampon citraté $O,IM/NaOH$

M

O,IM, soit un tampon phosphate type SORESENSEN : $PO_4H_2K \text{ — } /$
15

M
 $PO_4HNa_2 \text{ — } .$
15

Les essais de mobilisation du cuivre protéique par la résine (Na) ont été menés parallèlement sur des sérums normaux et sur la solution minérale, respectivement surchargés avec 0,10 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre sous forme de $CuCl_2$. Les sérums ont été dilués au 1/10 à l'aide de chacun des tampons annoncés, puis traités par la résine Amberlite I.R. 120 (Na) dans les conditions décrites plus haut.

3° Résultats et interprétation.

a) Aux pH 9 et 8. Bien que les conditions de pH ne soient pas favorables à une bonne ionisation du cuivre, puisque ce dernier commence à se transformer en hydroxyde de cuivre dès pH 8, le sérum fixe irréversiblement la totalité du cuivre ajouté. De même, l'affinité de la résine pour le cuivre est suffisante pour déplacer l'ensemble du cation de la solution aprotéique.

Cette observation montre que, malgré le faible produit de solubilité de $Cu(OH)_2$ ($s = 10^{-8}$), la constante de stabilité des complexes protéine-cuivre les plus labiles suffit encore à déplacer entièrement vers la gauche l'équilibre $Cu^{2+} + 2 OH^{-} \rightleftharpoons \downarrow Cu(OH)_2$.

b) A pH 6,7, 6,4, 5,7 et 5,3 l'emploi du tampon citraté conduit à des résultats inattendus puisque la solution minérale surchargée ne montre aucun décours de son taux de cuivre en fonction du temps. En fait, l'excès d'ion citrate de la solution par rapport au cuivre ajouté favorise la formation du complexe citrate de cuivre au détriment de la réaction d'échange avec la résine.

Nous nous sommes alors adressé au tampon phosphate avec lequel n'intervient aucune chélation du métal.

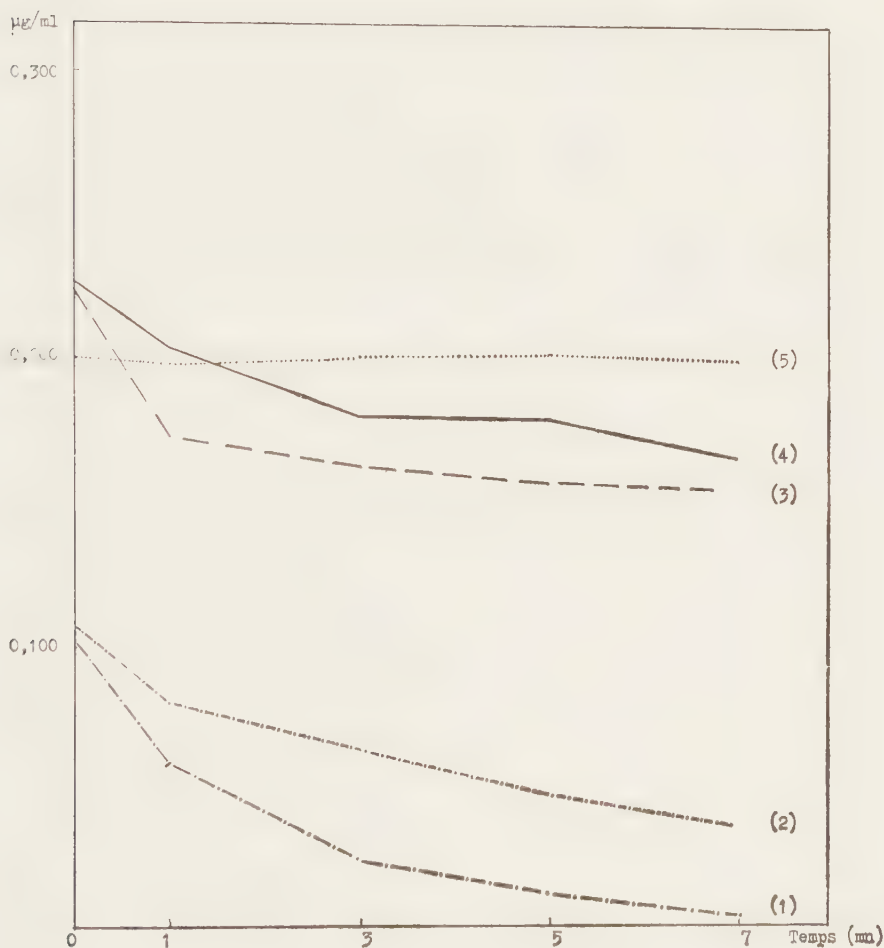


FIG. 13. — MOBILISATION DU CUIVRE PROTEIQUE A PARTIR D'UN SERUM SURCHARGE A L'AIDE D'UNE RESINE EN PHASE (Na), EN TAMPON PHOSPHATE. SOLUTION MINERALE DE CUIVRE (0,1 $\mu\text{g/ml}$) ETUDIEE A pH 6,7 (1) ET A pH 5,3 (2). SERUM HUMAIN SURCHARGE (0,1 $\mu\text{g/ml}$) ETUDIE A pH 5,3 (3), A pH 5,7 (4) ET A pH 6,7 (5).

- aux pH 6,7 et 6,4 les courbes d'enregistrement ne montrent toujours pas de décroissance, bien que la solution cuivrique minérale abandonne totalement le métal à la résine. Le résultat est donc toujours du même type qu'aux pH plus élevés. Néanmoins, il n'autorise pas à penser que certaines liaisons protéines-cuivre ne se soient pas fragilisées. En effet :
- aux pH 5,7 et 5,3 ; cette dernière valeur marquant la limite inférieure de la résine (Na), il s'avère possible d'amorcer un certain décours du taux de cuivre protéique en fonction du temps. La **figure 13** relève les variations du phénomène aux pH 6,7, 5,7 et 5,3. Elle est établie à partir d'un pool de sérums humains titrant environ 110 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ surchargé avec environ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cuivre sous forme de Cu Cl_2 (le volume final de l'essai correspondant à une dilution au 1/10 du volume initial de sérum).

Elle permet de faire les trois observations suivantes :

- A pH 6,7 les liaisons protéines-cuivre ne sont pas encore rompues la solution minérale manifestant toujours un abandon complet du cuivre. Cependant, la pente de décours de ce dernier s'avère moins abrupte que dans l'expérience initiale effectuée à un pH très peu différent de 7,5.
- A pH 5,7 après sept minutes de contact avec la résine, le sérum surchargé a perdu 28 % du cuivre.
- A pH 5,3, la pente de décroissance de la solution minérale s'est encore amoindrie ; au temps sept minutes, celle-ci retient encore 30 % de la surcharge effectuée au temps zéro. A son tour, le sérum surchargé a abandonné environ 35 % de son cuivre.

Bien que l'Amberlite en phase (Na) perde une partie de son activité au-dessous de pH 5,4, ainsi qu'on pouvait le prévoir, cette dernière valeur de pH permet la mise en évidence d'une certaine dissociation des complexes protéiques du cuivre les moins stables.

Les résultats de cette expérience tout en restant limités indiquent néanmoins que la stabilité de la liaison protéine-cuivre varie comme le pH.

Cette observation nous a incité à nous adresser aux résines échangeuses de cations, utilisées cette fois en phase (H) en espérant ainsi rompre les liaisons d'une façon à la fois discontinue et quantitative.

III. — METHODOLOGIE. MISE EN ŒUVRE D'UNE RESINE EN PHASE (H).

A) PRINCIPE.

L'opposition d'ions métalliques à une résine échangeuse de cations en cycle hydrogène fait apparaître deux phénomènes successifs :

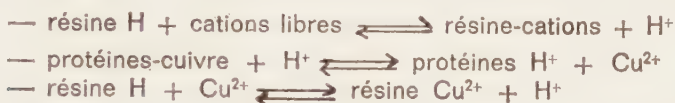
1° **La résine fixe tous les cations métalliques libres**, dans un ordre d'affinité caractéristique de son ou de ses groupements échangeurs. A ce titre une résine en phase (H) manifeste une plus grande activité que la même résine en phase (Na) puisque, pour obtenir cette dernière, il est nécessaire d'échanger les ions H^+ de l'échangeur natif contre les ions Na^+ d'une solution.

2° La résine règle elle-même le pH du milieu. En effet si on met un excès de résine en cycle H en présence d'une solution contenant des sels ionisés en concentrations croissantes, on note pour chacune de celles-ci des valeurs de pH décroissantes, proportionnelles à la concentration en ions de la solution fixée par la résine. Ces constatations sont d'ailleurs à la base d'une méthode possible de dosage de cations métalliques par simple détermination des pH ainsi réalisées.

Si, de plus, à une telle solution on ajoute des complexes métalliques sensibles aux variations de pH, dans la zone de ceux obtenus avec la solution saline seule, il est possible de fixer le métal du complexe dissocié.

Le schéma de ces réactions peut être envisagé sous la forme de trois équilibres successifs.

Si les complexes considérés sont du type : protéines-cuivre, on a :



chacun de ces équilibres possède évidemment sa constante propre (99).

On peut donc admettre que le premier équilibre est réalisé en très peu de temps ; dans ce cas, la constante n'agit pas comme facteur limitant des deux réactions suivantes. On peut tenir le même raisonnement sur le troisième équilibre.

Par contre, la seconde réaction est plus complexe et fait intervenir au moins deux constantes :

- la première règle la stabilité du complexe protéine-cuivre,
- la seconde définit le comportement de la protéine porteuse vis-à-vis du pH.

Ainsi la réaction générale :



est en fait la superposition de deux équilibres élémentaires :



$$\text{avec } \frac{(\text{protéine-NH}_2) \cdot (\text{Cu}^{2+})}{(\text{protéine-NH}_2\text{-Cu})} = K_c$$



$$\text{avec } \frac{(\text{protéine-NH}_2) \cdot (\text{H}^+)}{(\text{protéine-NH}_3^+)} = K_a$$

La constante apparente de la réaction (1) est une combinaison des deux constantes (2) et (3).

Si donc, à une solution du complexe protéine-NH₂-Cu on ajoute des ions H⁺, des protons disparaissent du milieu, l'équilibre de la réaction (1) se déplace vers la droite, le complexe se dissocie. Les ions Cu²⁺ libérés peuvent alors être captés par la résine.

Un calcul approché permet de mieux préciser les phénomènes.

En supposant le complexe stable et porteur d'un seul atome de cuivre :

(protéine-NH₂-Cu) $\neq$ C où C est la concentration du complexe ;

la concentration totale en protéine en tant qu'élément du complexe est égale à celle du cuivre.

D'autre part, on a les relations (2) et (3) avec les constantes K_c et K_s.

En éliminant (protéine-NH₂) entre les trois relations, le calcul donne :

$$(\text{Cu}^{2+})_{\text{solution}} = \sqrt{K_c \cdot C \left(1 + \frac{H^+}{K_s} \right)}$$

On voit donc que pour (H⁺) $\langle K_s$ ou pH $\rangle$ pK_s le rapport $\frac{(H^+)}{K_s}$ devient négligeable par rapport à 1 :

$$(\text{Cu}^{2+})_{\text{solution}} = \sqrt{K_c \cdot C}$$

c'est ce qui se passe dans les expériences précédentes au-dessus de pH 5,3 ; le pH n'exerce dans ce cas aucune influence.

Par contre, pour pH $\langle$ pK_s, 1 devient rapidement négligeable par rapport à

$$\frac{(H^+)}{K_s} \text{ et } (\text{Cu}^{2+}) = \sqrt{K_c \cdot C \cdot \frac{(H^+)}{K_s}}$$

La concentration de la forme Cu²⁺ croît donc comme H^{+1/2}.

En conséquence, la conclusion suivante peut être formulée : la concentration en Cu²⁺ à un pH donné dépend de la valeur de K_c et de K_s. En théorie, si plusieurs complexes coexistent en solution, chacun étant caractérisé par ses K_c et K_s respectives, une résine échangeuse se comportera à l'égard du cation d'une façon discontinue. En particulier, elle captera d'abord la totalité du cuivre du complexe le moins stable et de plus forte constante d'ionisation avant d'agir sur celui du complexe de stabilité supérieure et de moindre constante d'ionisation.

Ce sont ces considérations qui nous ont amené à utiliser les résines en phase (H) pour tenter de résoudre notre problème.

B) MATERIEL ET METHODE.

1° Matériel.

Il est identique à celui utilisé pour l'expérimentation sur résine en cycle de sodium.

Cette dernière est simplement remplacée par une résine Amberlite I.R. (H) 120. Nous avons utilisé une résine (H) commerciale ; rien n'empêche d'employer une résine (Na) régénérée préalablement par l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à disparition des ions sodium des eaux de lavage.

Les milieux protéiques essayés sont les suivants :

- sérums humains normaux,
- sérums de femmes en gestation,

- sérums de sujets atteints d'affections hépatiques de divers types, diagnostiqués tant par la clinique que par la biologie clinique,
- sérum d'un sujet atteint de collagénose,
- sérum d'un sujet atteint de la maladie de Wilson,
- différents milieux protéiques : albumines humaine et bovine cristallisées,
- plasmas de rats normaux et surchargés en cuivre par la voie orale selon le protocole décrit dans la deuxième partie.

Le taux de céruléoplasmine sérique ou plasmatique a été apprécié en mettant à profit les propriétés oxydasiques de la protéine vis-à-vis de la paraphénylène-diamine. La technique (*) utilisée permet d'évaluer le taux de céruléoplasmine en mg pour 100 ml de sérum ou de plasma en comparant la coloration bleue obtenue à partir d'une dilution de ces derniers à la coloration d'une solution de la protéine de concentration connue.

Les pH obtenus au cours du traitement des premiers échantillons expérimentés ont été mesurés à l'aide d'un pH mètre à électrode de verre (**).

2° Méthode.

Les sérums humains et les plasmas de rats ont été étudiés avant et après surcharge cuivrique, sur une dilution au 1/10 dans l'eau bidistillée.

Les milieux protéiques artificiels ont été dilués dans la solution saline pour obtenir un taux de protides approchant 70 g par litre.

Chaque milieu, protéique ou non, a été étudié en l'opposant à 1 gramme de résine en phase hydrogène. L'activité de celle-ci a été testée à l'aide du « sérum artificiel », précédemment défini, contenant un ajout de CuCl_2 correspondant à environ 0,15 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre.

Bien que toutes les expériences aient montré que la capacité de fixation de 1 gramme de résine est satisfaisante pour capter, en un temps très court, tout le cuivre ionique d'une telle solution, ne risquant donc pas d'intervenir comme facteur limitant de la quantité de cuivre mobilisée à partir de la protéine, nous avons voulu vérifier plus sûrement l'absence de cette interférence dans le cas du sérum. Pour cela, nous avons réalisé deux essais de contrôle :

- un même sérum a été traité successivement par deux fois 1 gramme de résine sèche,
- une seconde partie aliquote l'a été en une fois par 2 grammes de la même résine.

Cette expérience a montré que le taux de cuivre restant lié aux protéines après action de la résine est identique dans les trois cas.

L'agitation magnétique réglée pour un contact efficace entre les deux phases a été maintenue uniforme dans toutes les expériences. On ne saurait trop insister sur l'importance de ce paramètre qui, mal fixé, peut constituer une cause d'erreur certaine pour deux raisons :

(*) Céruloplasmin Screening Test Set DADE REAGENTS, INC. MIAMI, FLORIDA.

(**) PH RADIOMETER 25-25 S E - 27.

- une agitation trop lente ne réalise pas une répartition suffisante de la résine dans la solution aqueuse, dont les densités respectives sont assez différentes ;
- une agitation trop rapide, insuffisamment centrée, a tendance à refouler la résine sur les parois du récipient.

Les temps de prélèvements des échantillons à doser ont été finalement fixés à 0,1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 minutes après la mise en contact de la résine avec la solution à traiter. Cette durée s'est avérée nécessaire, surtout avec les sérums dont le taux de cuivre était très supérieur à la normale physiologique ; elle a été dans tous les cas assez longue pour obtenir la phase asymptotique de la courbe de décours.

TABLEAU XV

VARIATIONS DES CONCENTRATIONS EN CUIVRE ET DES VALEURS DU pH EN FONCTION DU TEMPS DANS UNE SOLUTION AQUEUSE CONTENANT 0,15 $\mu\text{g/ml}$ DE CUIVRE (I), PUIS DANS UN SERUM HUMAIN NORMAL (II) ET DANS CE MEME SERUM SURCHARGE AVEC 0,15 $\mu\text{g/ml}$ DE CUIVRE (III) EN PRESENCE D'UNE RESINE AMBERLITE EN PHASE H

SOLUTIONS	Temps de contact en minutes	pH	$\mu\text{g/ml}$
I	0	8,10	0,153
	1	3,10	0,063
	3	2,60	0
	5	2,35	0
	7	2,35	0
	9	2,35	0
II	0	8,40	0,155
	1	3,00	0,130
	3	2,80	0,112
	5	2,50	0,069
	7	2,50	0,058
	9	2,50	0,053
III	0	8,20	0,317
	1	3,00	0,266
	3	2,75	0,171
	5	2,50	0,088
	7	2,50	0,070
	9	2,50	0,055

C) VALEUR DE LA METHODE.

1° Mise en évidence de la dissociation discontinue de complexes protéiques du cuivre.

Il s'agit d'apporter expérimentalement la preuve de la possibilité théorique de libérer le cuivre, lui-même entièrement lié aux protéines. La ciné-

tique de cette libération est suivie en comparant l'action de l'Amberlite respectivement sur une solution saline de concentration en cuivre connue, et sur un sérum humain normal, puis surchargé par un excès cuivrique.

Les trois essais préliminaires ont été effectués de la façon suivante :

- solution I : 2 ml de solution minérale + 2 ml d'une solution titrant $1,5 \mu\text{g/ml}$ de cuivre + 16 ml d'eau bidistillée ;
- solution II : 2 ml de sérum normal + 18 ml d'eau bidistillée ;
- solution III : 2 ml de sérum normal + 2 ml de la solution à $1,5 \mu\text{g/ml}$ de Cu + 16 ml H₂O bidistillée.

Les prélèvements ont été faits après 0, 1, 3, 5, 7, 9 minutes.

Le **tableau XV** reproduit en fonction du temps, les valeurs du pH et de la concentration en cuivre.

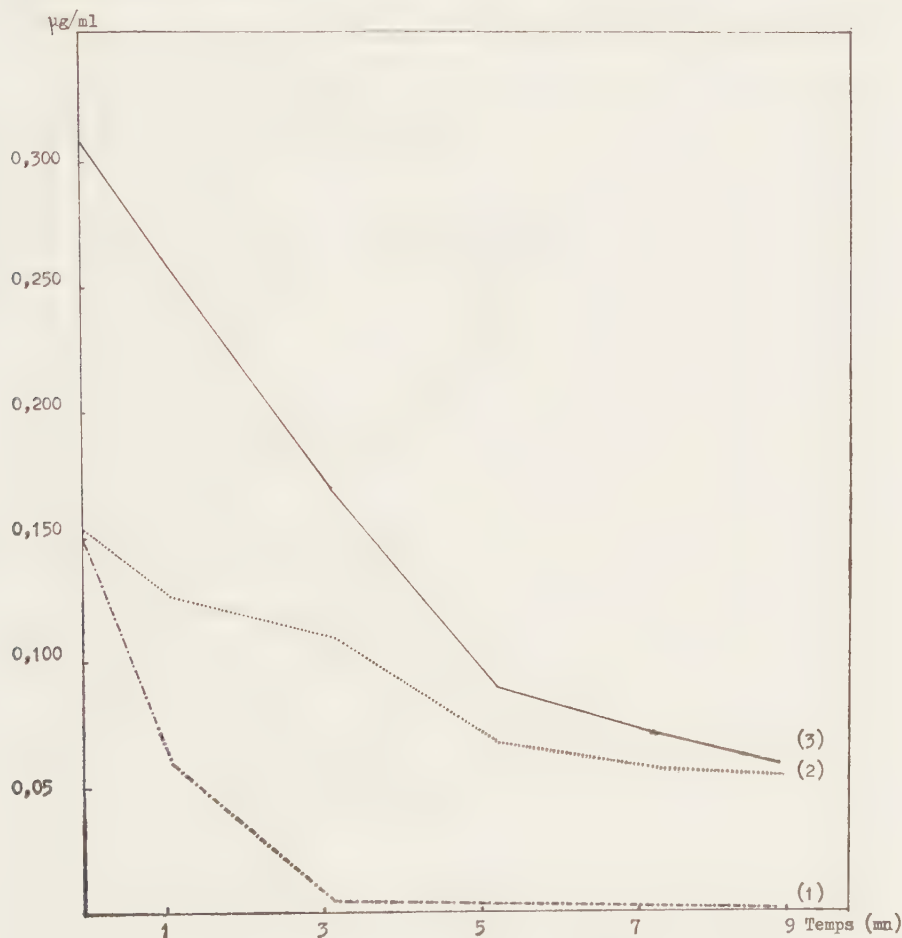


FIG. 14. — ACTIVITE D'UNE RESINE EN PHASE (H) MISE EN EVIDENCE D'UNE DISSOCIATION DISCONTINUE. SOLUTION MINERALE TITRANT $0,15 \mu\text{g/ml}$ EN Cu^{2+} (1). SERUM NORMAL DILUE AU 1/10 (2). SERUM NORMAL SURCHARGE AVEC $0,15 \mu\text{g/ml}$ DE Cu^{2+} (3).

La **figure 14** illustre les décroissances du taux de cuivre en fonction du temps.

A partir de cette première expérience, quatre remarques peuvent être faites :

a) La solution artificielle (courbe I) surchargée avec 0,15 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre fournit une décroissance très rapide, Après trois minutes de contact, les concentrations restantes en solution deviennent inappréciables ; ceci prouve que la réaction n'est pas limitée par la capacité de fixation de la résine.

b) Les pH obtenus aux différents temps sont réglés par les ions libres en solution, ce que confirme un contrôle effectué sur une prise d'essai de la solution saline non surchargée en cuivre. Les légers décalages observés entre les valeurs propres à cette dernière et celles afférentes au sérum normal proviennent des différences de concentration en cations métalliques totaux dans les deux types de milieu.

c) L'examen de la courbe II du sérum normal montre qu'une partie du cuivre protéique est libérée du sérum et captée par la résine. La mobilisation se réalise progressivement, la pente de décours comparée à celle de la solution artificielle reflète la résistance des liaisons à se laisser rompre par les variations de pH.

Une observation plus attentive de la courbe montre, après trois minutes, une rupture de la pente de décroissance laissant à penser qu'on est en présence de deux phénomènes successifs :

- l'un caractéristique d'une fraction labile, entre les temps zéro et trois minutes,
- l'autre pouvant justifier l'existence d'un cuivre fixé au substrat protéique à l'aide de liaisons plus fortes.

De plus, entre les temps cinq et neuf minutes, la décroissance est asymptotique, indiquant la présence d'un cuivre non mobilisable dans les conditions de l'expérience.

d) Quant à la courbe III établie à partir du même sérum mais après un ajout de 0,15 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre minéral, elle est, en apparence, constituée d'une unique décroissance. La pente entre les temps zéro et cinq minutes est plus accusée que dans le cas du sérum normal.

Par contre, la valeur la plus faible du cuivre restant fixé aux protéines se trouve être, après neuf minutes, pratiquement identique à celle obtenue à partir du sérum simple.

En somme, à ce niveau, trois observations attirent l'attention :

- hétérogénéité des pentes respectives de décours,
- esquisse d'une dissociation dans la diminution de la teneur en cuivre du sérum normal non surchargé,
- les asymptotes des courbes II et III se confondent pour une valeur du taux du cuivre qui marquerait la limite d'activité de la résine dans ces conditions bien que la capacité de fixation de celle-ci soit encore loin de la saturation.

Ces premières observations nous ont incité à faire une étude critique des différents paramètres de la réaction.

TABLEAU XVI

VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DU CUIVRE SÉRIQUE EN FONCTION DU TEMPS DANS QUATRE SÉRUMS HUMAINS SUPPOSES NORMAUX EN PRÉSENCE DE RESINE AMBERLITE EN PHASE H

Temps (mn)	Concentrations en cuivre (µg/ml)			
	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 3	Sérum 4
0	0,140	0,155	0,136	0,120
1	0,125	0,139	0,118	0,105
2	0,108	0,125	0,107	0,104
3	0,105	0,119	0,105	0,098
5	0,061	0,079	0,072	0,059
7	0,059	0,071	0,062	0,051
9	0,056	0,069	0,060	0,049

2° Paramètres propres au sérum.

a) Reproductibilité du phénomène de double décroissance :

A cette fin, l'expérience précédente a été répétée avec quatre sérums différents, tous supposés normaux.

Le **tableau XVI** donne les résultats obtenus :

En traçant les courbes correspondantes (**figure 15**), on vérifie que le phénomène est reproductible, encore plus net que dans l'expérience précédente ; d'ailleurs, tous les essais suivants le confirmeront.

On note, de plus, que les valeurs finales se situent entre 0,05 et 0,07 µg/ml et que les rapports $Cu_{t=3\text{ mm}}/Cu_{t=9\text{ mm}}$ sont assez constants.

b) Influence éventuelle de la dilution du sérum sur la dissociation des complexes protéiques du cuivre.

Afin d'éliminer ce facteur, l'expérience a été conduite deux fois sur un même sérum mais à l'aide de deux dilutions différentes, l'une au 1/5 et l'autre au 1/10.

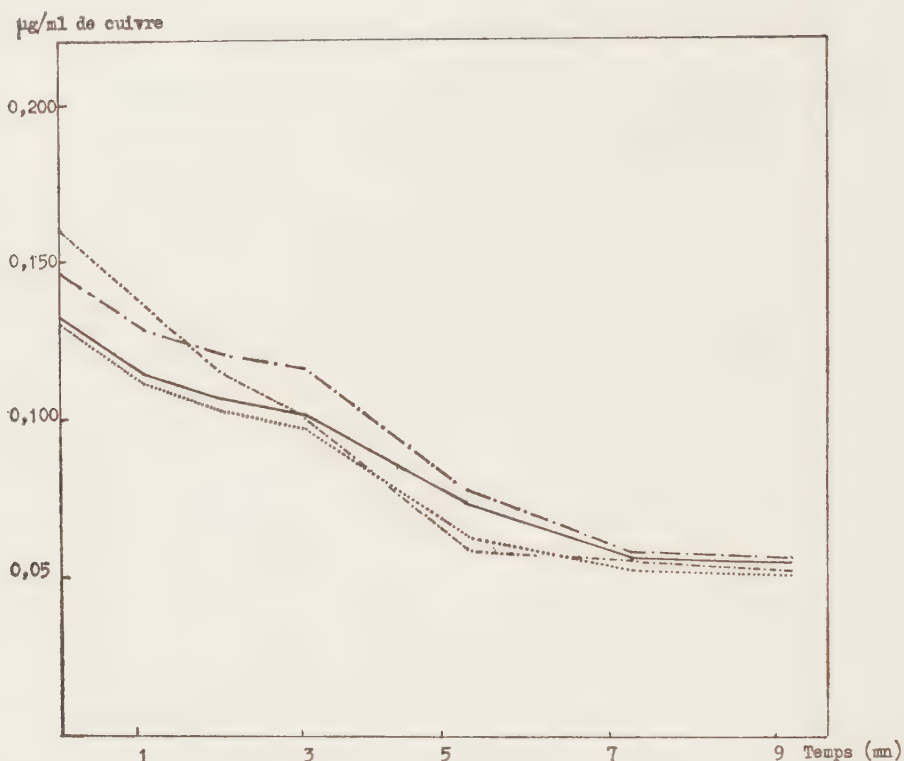


FIG. 15. — REPRODUCTIBILITE DU PHENOMENE DE DOUBLE DECROISSANCE ETUDIE A L'AIDE DE QUATRE SERUMS HUMAINS SUPPOSES NORMAUX.

TABLEAU XVII

VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DU CUIVRE SERIQUE ET DES VALEURS DE pH EN FONCTION DU TEMPS DANS UN SERUM HUMAIN DILUE SUCCESSIVEMENT AU 1/5 PUIS AU 1/10 EN PRESENCE D'UNE RESINE AMBERLITE EN PHASE H

Temps	Sérum 1/5		Sérum 1/10	
	µg/ml	pH	µg/ml	pH
0	0,245	8,10	0,122	8,10
1	0,218	2,80	0,110	2,95
2	0,194	2,65	0,098	2,80
3	0,193	2,50	0,098	2,75
5	0,145	2,50	0,072	2,75
7	0,118	2,35	0,061	2,75
9	0,115	2,35	0,058	2,75

Le **tableau XVII** collecte les résultats des dosages auxquels sont adjointes les différentes valeurs de pH observées dans les deux cas.

On constate que les pH sont nettement décalés vers les moindres valeurs avec le sérum dilué au 1/5 ; ceci n'a rien d'étonnant puisque la concentration en ions métalliques de toute nature est deux fois plus élevée dans ce cas.

La **figure 16** illustre la simple translation verticale des deux courbes. Les rapports des concentrations aux temps trois minutes et neuf minutes sont proches de la valeur idéale. Ce résultat permet d'éliminer l'interférence du phénomène de dilution.

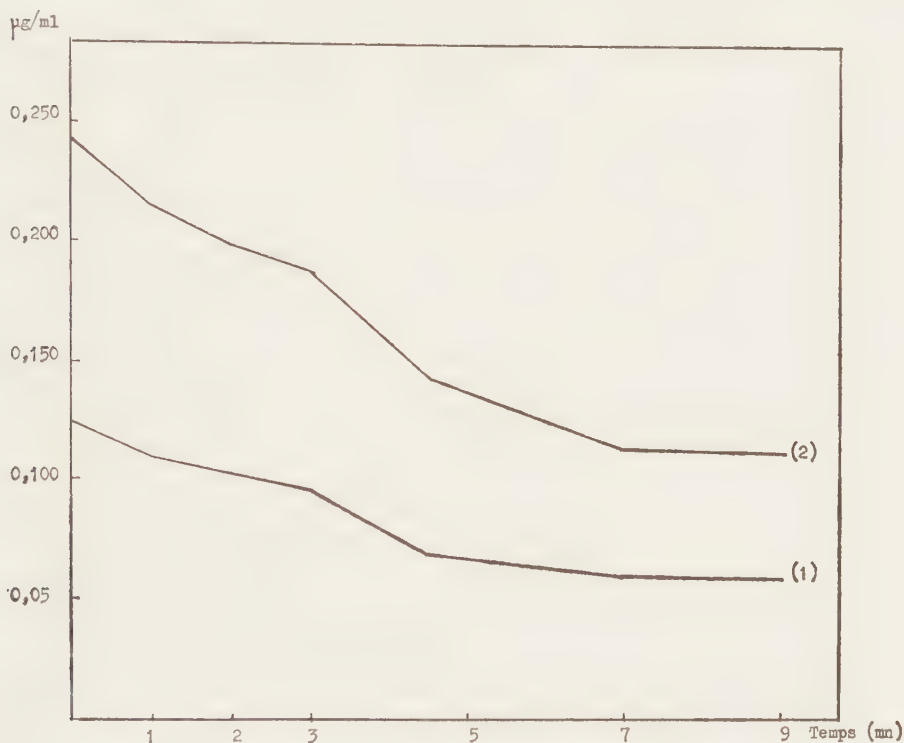


FIG. 16. — INFLUENCE DE LA DILUTION DU SERUM SUR LA MOBILISATION DU CUIVRE PROTEIQUE PAR UNE RESINE EN PHASE (H). SERUM NORMAL DILUE AU 1/10 (1), MEME SERUM DILUE AU 1/15 (2).

3° Paramètres propres à la résine.

a) Influence de la concentration en résine.

Un même sérum a été traité successivement par deux fois un gramme de résine sèche. Le taux de cuivre restant lié aux protéines après le deuxième temps est identique à celui mesuré après le premier temps.

Trois sérums ont, d'autre part, été essayés avec un et deux grammes de résine sèche. Ici encore les résultats ne varient pas sensiblement d'une expérience à l'autre, ce qu'illustre le **tableau XVIII**.

TABLEAU XVIII

COMPARAISON DES VARIATIONS DE CONCENTRATION DU CUIVRE SERIQUE
EN FONCTION DU TEMPS DANS TROIS SERUMS HUMAINS
MIS EN PRESENCE SUCCESSIVEMENT AVEC 1 ET 2 GRAMMES
DE RESINE AMBERLITE EN PHASE H

Temps	Sérum 1		Sérum 2		Sérum 3	
	1 gr	2 gr	1 gr	2 gr	1 gr	2 gr
0	0,157	0,155	0,136	0,133	0,120	0,120
1	0,140	0,139	0,120	0,118	0,107	0,105
2	0,120	0,125	0,108	0,107	0,102	0,104
3	0,120	0,119	0,106	0,105	0,099	0,098
5	0,076	0,079	0,070	0,072	0,061	0,053
7	0,072	0,070	0,60	0,063	0,053	0,051
9	0,071	0,069	0,060	0,60	0,050	0,049

b) Influence de la concentration en ions Cu^{2+} .

Un dernier facteur nous a paru intéressant à étudier, celui concernant l'influence de la concentration en ions Cu^{2+} sur la forme de la courbe de mobilisation du sérum. On a déjà vu dans la première expérience que l'addition de 0,15 $\mu\text{g/ml}$ de Cu^{2+} dans le sérum masquait les points remarquables de la courbe de décroissance entre les temps deux et trois minutes.

A cette fin, solution saline et sérum normal ont été surchargés successivement avec 0,08, 0,15 et 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de Cu^{2+} .

Le **tableau XIX** permet de comparer les résultats. La **figure 17** montre que, si la solution artificielle atteint sa plus basse valeur après trois minutes, soit dans les deux premiers cas, il n'en est plus de même quand on s'adresse à des surcharges plus importantes, soit au sérum normal.

En fait, il est malaisé de discerner la part qui revient à la résine et celle provenant du sérum. Il est cependant facile de constater que, pour de fortes concentrations en cuivre, la vitesse de fixation de la résine diminue d'une façon significative ; il faut attendre au moins cinq minutes de contact pour obtenir une valeur nulle. Cependant, ceci n'explique pas entièrement le comportement des sérums entiers surchargés. En effet, on a vu dans l'étude consacrée à l'influence de la concentration en résine qu'un sérum dilué au 1/5 donne un résultat en tout point comparable à ce même sérum dilué au 1/10. On notait cependant un décalage des pH vers des valeurs moindres avec le sérum dilué au 1/5.

TABLEAU XIX

ACTIVITE COMPAREE D'UNE RESINE AMBERLITE EN PHASE H EN PRESENCE
D'UNE SOLUTION MINERALE DE CONCENTRATION CROISSANTE
EN CUIVRE (0,08-0,15-0, 25 $\mu\text{g/ml}$) ET D'UN SERUM NORMAL
PUIS SURCHARGE AVEC 0,08 ET 0,15 $\mu\text{g/ml}$ DE CUIVRE

Temps (mn)	Solution saline			Sérum normal		
	+ 0,08	+ 0,15	+ 0,25	+ 0,08	+ 0,15	0
0	0,081	0,162	0,220	0,195	0,276	0,122
1	0,054	0,075	0,100	0,172	0,240	0,110
2	0,036	0,037	0,060	0,148	0,205	0,098
3	0,011	0,012	0,032	0,145	0,179	0,098
5	0	0,06	0,014	0,105	0,123	0,072
7	0	0	0,09	0,083	0,088	0,060
9	0	0	0	0,061	0,067	0,058

Or, dans l'expérience qui nous occupe, les concentrations totales en ions libres sont sensiblement les mêmes dans tous les cas, si on néglige l'apport des ions Cu^{2+} . Le pH ne varie pas d'une surcharge à l'autre. On peut donc penser qu'à la diminution de vitesse de captation de la résine s'ajoutent des valeurs moyennes de pH devenant limites pour dissocier le surcroît de complexes formés. L'équilibre Cu^{2+} /résine est moins vite déplacé vers cette dernière.

Ce serait la somme de ces deux phénomènes : diminution de la vitesse de fixation et valeurs limites de pH, qui masquerait les accidents de la courbe ; les équilibres aux points remarquables se chevauchent, l'excès de cuivre étant complexé sous la forme de la fraction la plus labile et l'asymptote est atteinte après un temps plus long.

Il est donc important, avec des sérums riches en cuivre, de prolonger le temps de contact pour être certain d'atteindre l'asymptote de la courbe de décroissance ; onze minutes de contact se sont avérées suffisantes dans tous les cas.

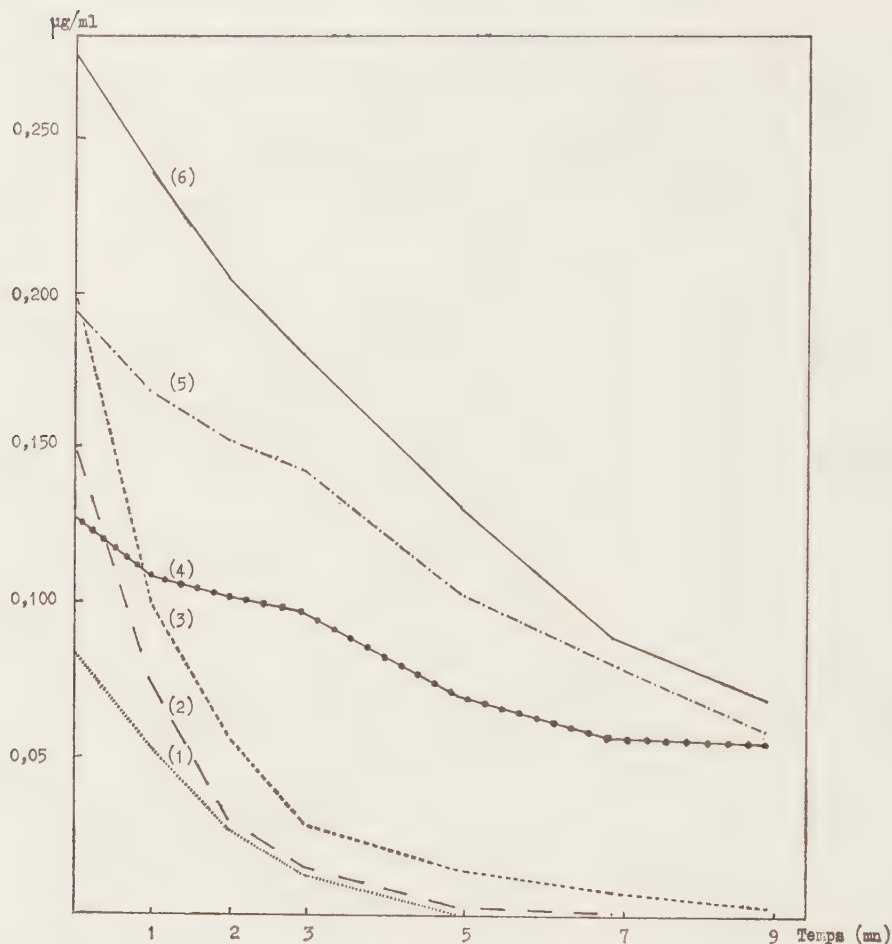


FIG. 17. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CUIVRE SUR L'ALLURE DES COURBES DE MOBILISATION PAR UNE RESINE EN PHASE (H). SERUM ARTIFICIEL ADDITIONNE DE 0,08 (1) DE 0,15 (2) ET 0,20 $\mu\text{g/ml}$ DE CUIVRE (3). SERUM NORMAL SIMPLE (4) PUIS SURCHARGE AVEC 0,08 (5) ET 0,15 $\mu\text{g/ml}$ DE CUIVRE (6).

4° Conclusion.

L'allure des courbes de mobilisation du cuivre de son substrat protéique par l'échangeur de cation reflète l'intensité des forces de liaisons protéine-cuivre, liaisons appartenant au moins à deux types de complexes auxquels on peut adjoindre un troisième, représenté par le métal non mobilisé, objectivé par l'asymptote de la courbe finale.

On voit ainsi se dessiner l'image de trois compartiments distincts du cuivre circulant : deux compartiments caractérisés par des labilités propres du cuivre protéique, le troisième où le cation reste intégré à un complexe sur lequel l'action conjuguée des variations de pH et de l'affinité de la résine ne parvient pas à diminuer la stabilité.

IV. — APPLICATIONS DE LA METHODE A L'ETUDE DU CUIVRE DANS LE SERUM NORMAL.

Les recherches préliminaires dont nous venons de présenter les résultats ont été menées sur des pools de sérums humains supposés normaux. En fait ces pools ont été réalisés à partir de sang de sujets ne manifestant ni insuffisance hépatique apparente, ni signes d'atteintes rhumatismales, état pathologique accusant les plus franches élévations de la cuprémie. Ceci n'est évidemment pas suffisant pour assurer que de tels sujets soient considérés comme normaux, puisque tous les échantillons de sérums utilisés proviennent de malades hospitalisés. Néanmoins, la moyenne normale de 130 $\mu\text{g } \%$ (± 20) à laquelle nous nous sommes attaché est très proche des moyennes particulières rencontrées dans l'expérimentation précédente. Quatre des cas rapportés ici titrent, en effet, respectivement 127, 126, 155, 140 $\mu\text{g } \%$, soit une moyenne de 136,75 $\mu\text{g } \%$.

Il était intéressant, à ce stade, de chercher expérimentalement une relation entre l'une et l'autre des fractions protéiques du sérum et les compartiments précédemment mis en évidence.

Nous avons eu sans cesse présente à l'esprit la notion classique de fractions albuminique et céruléoplasmique ainsi que leurs pourcentages respectifs de 7 et 93 $\%$ du cuivre total. Il faut cependant se souvenir que de telles valeurs sont le résultat de l'application d'une méthode chimique, fondée sur la réaction directe du diéthylthiocarbamate de sodium sur le cuivre dit albuminique, indirecte, après acidification du sérum, sur le cuivre dit céruléoplasmique. Ce mode de classification des formes du cuivre circulant reste arbitraire car rien n'indique dans la littérature que le type d'action du réactif soit spécifique de l'un ou l'autre des deux compartiments envisagés.

TABLEAU XX

VALEURS EXPRIMEES EN POURCENTAGE DU CUIVRE SERIQUE TOTAL
DES DIFFERENTES FRACTIONS MISES EN EVIDENCE
DANS QUATRE SERUMS HUMAINS TRAITES PAR UNE RESINE AMBERLITE
EN PHASE H

SERUMS	CUIVRE TOTAL $\mu\text{g } \%$	% DU CUIVRE TOTAL		
		FRACTION I	FRACTION II	FRACTION III
1	127	7,90	47,3	44,8
2	126	9,20	46,3	44,4
3	155	10,75	46,2	43,05
4	140	8,50	45,3	46,2
MOYENNES	136,75	9,09	46,30	44,61

Néanmoins, les résultats énoncés ne sont pas éloignés de ceux fournis par nos propres expériences. En effet, le **tableau XX** rapporte les valeurs sous forme de pourcentage, des trois fractions obtenues successivement à partir des quatre essais pratiqués dont nous venons de donner les taux moyens de cuivre total.

Les pourcentages ont été calculés en déterminant les teneurs en cuivre correspondantes aux ordonnées à l'origine des deux phases asymptotiques de chaque courbe de décroissance.

L'analyse des quatre courbes (**figure 15**) montre que la fraction la plus labile objectivée par la première décroissance représente pour chacun des quatre essais 7,90, 9,20, 10,75 et 8,50 % du cuivre total, soit une moyenne d'environ 9 %, donc sensiblement supérieure de 2 % à celle annoncée grâce à la méthode chimique.

Par contre, la valeur de 93 % trouvée après acidification préalable du sérum et extraction en milieu organique ne s'approche en rien de l'un ou l'autre des chiffres caractéristiques des deux dernières fractions. Mais la somme des deux fournit un pourcentage d'environ 91 %, inférieur de 2 % à la valeur précédente.

Or, on constate que ces taux de cuivre sont sensiblement égaux à ± 2 % près. Il est par conséquent tentant de rapporter l'un et l'autre à la céruléoplasmine sérique.

Deux moyens expérimentaux nous ont semblé aptes à élucider le problème de ces deux dernières fractions :

- soit en appliquant la méthode à un sérum et à une solution protéique dépourvue de céruléoplasmine ;
- soit en calculant le taux de céruléoplasmine à partir de la teneur en cuivre des deux fractions considérées, afin de la comparer aux valeurs mesurées expérimentalement par le « screening test ».

A) APPLICATION DE LA METHODE DE MOBILISATION DU CUIVRE A UN SERUM ET A DES SOLUTIONS PROTEIQUES DEPOURVUS DE CERULEOPLASMINE.

Nous nous sommes adressé d'abord à un sérum prélevé chez un sujet atteint de la maladie de Wilson, chez lequel ont été pratiqués à plusieurs reprises des bilans de cuivre. Il s'agit d'un sérum titrant environ 25 μg % de cuivre total, ne donnant pas de réaction positive à la paraphénylène-diamine, le malade élimine environ 0,70 mg de cuivre par 24 heures.

Nous avons ensuite utilisé une solution d'albumine humaine titrant sensiblement 70 g/litre et une solution d'albumine bovine présentant à peu près la même concentration protéique.

L'expérience de mobilisation du cuivre fut conduite de façon à comparer les allures des courbes de décroissance en s'adressant respectivement au sérum lui-même (A), à ce même sérum surchargé avec environ 0,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cuivre. (B), à un sérum normal (C), enfin aux solutions d'albumine humaine (D) et bovine (E) toutes deux surchargées avec 0,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cuivre. L'activité de la résine fut toujours testée à l'aide d'un « sérum artificiel » (F) additionné de 0,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cuivre sous forme de Cu Cl_2 . Le temps global

de contact de chacun de ces milieux dilués au 1/10 avec un gramme de résine Amberlite I.R. 120 (H) a été fixé à onze minutes.

Notons que les dilutions des solutions D et E ont été réalisées avec le « sérum artificiel » afin de maintenir la concentration saline dans la même zone que le sérum normal.

TABLEAU XXI

VARIATIONS DES CONCENTRATIONS EN CUIVRE OBSERVEES EN COURS DU TRAITEMENT PAR UNE RESINE AMBERLITE EN PHASE H, D'UN SERUM DE MALADIE DE WILSON (A) DE CE MEME SERUM SURCHARGE AVEC ENVIRON 0,20 $\mu\text{g/ml}$ DE CUIVRE (B) D'UN SERUM NORMAL (C) DE DEUX SOLUTIONS D'ALBUMINE HUMAINE (D) ET BOVINE (E) CHACUNE ADDITIONNEE DE 0,20 $\mu\text{g/ml}$ DE CUIVRE ET D'UNE SOLUTION MINERALE (F) TITRANT 0,20 $\mu\text{g/ml}$ DE CUIVRE

TEMPS en mn	TAUX DE CUIVRE ($\mu\text{g/ml}$)					
	A	B	C	D	E	F
0	0,027	0,246	0,127	0,250	0,227	0,200
1	0,022	0,204	0,113	0,192	0,180	0,100
2	0,012	0,170	0,110	0,164	0,160	0,060
3	0,007	0,139	0,106	0,127	0,130	0,032
5	0,004	0,086	0,061	0,066	0,069	0,014
7	0	0,045	0,052	0,016	0,022	0,09
9	0	0,018	0,050	0,004	0,014	0
11	0	0	0,050	0	0,014	0

Les résultats du **tableau XXI** et les **figures 18 et 19** révélant un comportement normal de la résine vis-à-vis de la solution saline et du sérum normal mettent en évidence deux résultats concordant d'une façon satisfaisante :

- le sérum Wilsonien non surchargé se comporte comme s'il ne possédait que la première fraction mobilisable d'un sérum normal. Néanmoins, il faut noter que si l'asymptote est obtenue après le même temps de contact de trois minutes, la pente de la courbe est moins accentuée que celle du sérum normal ;
- le sérum Wilsonien surchargé fournit une courbe de décours en tous points semblable à celle d'une solution d'albumine humaine ; notamment, la libération du cuivre protéique est complète après onze minutes.

On remarque que le taux de cuivre ne s'annule pas exactement dans la phase terminale de la courbe établie avec la solution d'albumine bovine. Nous avons vérifié qu'une telle solution contenait des traces de céruloplasmine.

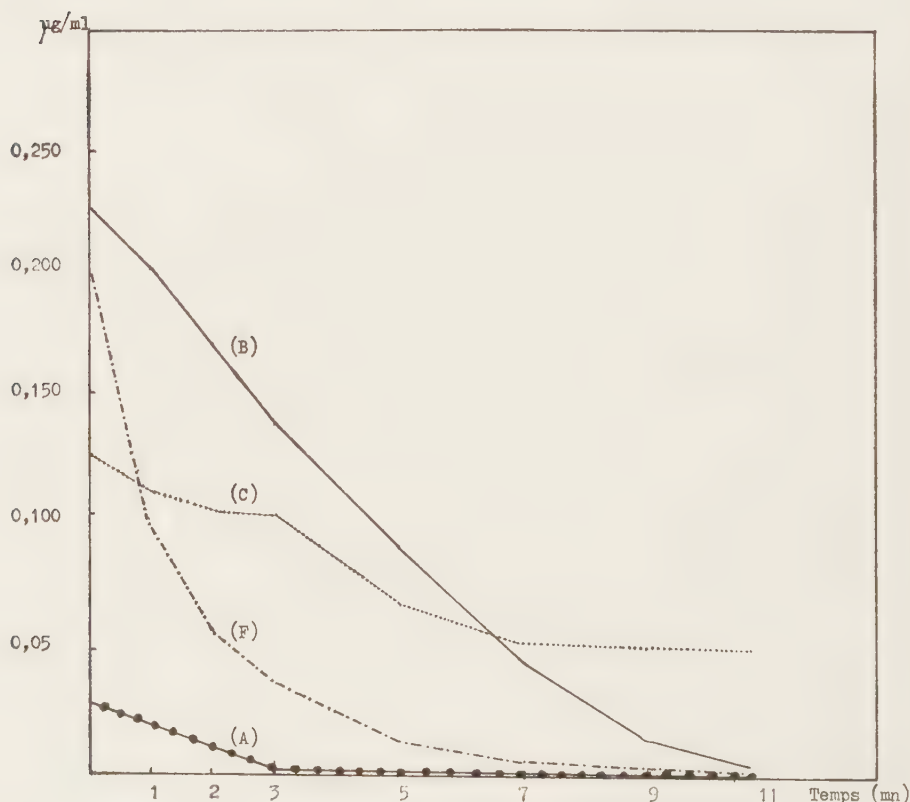


FIG. 18. — ACTIVITE D'UNE RESINE EN PHASE H VIS-A-VIS D'UN SERUM DE MALADIE DE WILSON (A), DE CE MEME SERUM SURCHARGE AVEC $0,20 \mu\text{g/ml}$ de Cu^{2+} (B) D'UN SERUM NORMAL (C) ET D'UNE SOLUTION AQUEUSE SALINE CONTENANT $0,20 \mu\text{g/ml}$ DE Cu^{2+} (F).

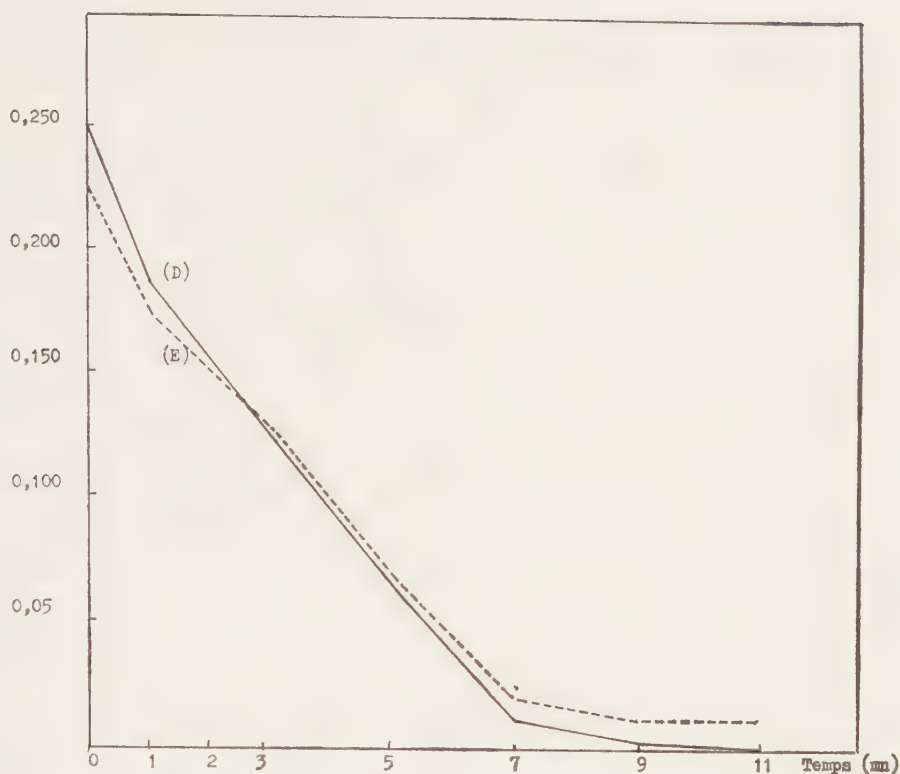


FIG. 19. — ACTIVITE D'UNE RESINE EN PHASE (H) VIS-A-VIS D'UNE SOLUTION SALINE CONTENANT 70 g/l D'ALBUMINE HUMAINE ET 0,20 $\mu\text{g/ml}$ DE Cu^{2+} (D) ET D'UNE SOLUTION D'ALBUMINE BOVINE DE MEME CONCENTRATION EN PROTEINE ET EN CUIVRE (E).

B) COMPARAISON DU TAUX DE CERULEOPLASMINE OBTENU PAR CALCUL A PARTIR DES DEUX DERNIERES FRACTIONS ET PAR EVALUATION EXPERIMENTALE.

Bien que les résultats précédents prouvent que la somme des valeurs des dernières fractions de cuivre mises en évidence par les expériences précédentes reflète le cuivre céruléoplasmique, il est possible d'apporter un certain nombre d'arguments supplémentaires en comparant d'une part les taux de céruléoplasmine calculés et ceux évalués expérimentalement par les méthodes classiques et en cherchant à suivre la diminution de l'activité oxydasique du sérum au cours du traitement de ce dernier par la résine.

1. Principe de calcul.

Une molécule de céruléoplasmine de poids moléculaire égal à 151 000 correspondant à huit atomes de cuivre (P.A. = 64), une simple règle de trois permet de connaître le taux de la protéine à partir de la somme des deux valeurs lues sur le graphique de décours. Si cette somme est attri-

buable au cuivre céruléoplasminique, représentant la concentration en cuivre, on obtient le taux de céruléoplasmine en mg/100 ml de sérum à l'aide de la formule suivante :

$$\frac{151\,000 \cdot X}{504} \cdot 10 = \text{mg/100 ml de sérum}$$

TABLEAU XXII

**COMPARAISON DES TAUX DE CERULEOPLASMINE SERIQUE
DETERMINEES SUCCESSIVEMENT DANS QUATRE SERUMS HUMAINS
PAR LA METHODE DE MOBILISATION PROGRESSIVE DU CUIVRE SERIQUE
ET PAR COLORIMETRIE DE LA REACTION OXYDASIQUE**

SERUMS	TAUX DE CERULEOPLASMINE (mg/100 ml)	
	CALCUL	SCREENING-TEST
1	37,5	35
3	39	40
2	33,5	25
4	32,5	25

Le **tableau XXII** compare les valeurs obtenues par les deux méthodes appliquées respectivement sur les quatre sérums normaux dont les courbes de mobilisation sont représentées sur la **figure 15** précédente.

Les correspondances sont assez satisfaisantes si l'on tient compte que la méthode du « screening test » donne les résultats à 10 % près, la valeur normale annoncée par celle-ci est de 20 mg % contre 15 à 30 mg % (23) avec les méthodes spectrophotométriques indiscutablement plus précises.

2. Nous avons, d'autre part, évalué qualitativement la diminution de l'activité oxydasique au cours du traitement d'un sérum dilué au 1/5. Après trois minutes, l'activité était sensiblement identique à celle du temps zéro ; par contre, après sept minutes de contact, la réaction ne révélait plus que des traces de céruléoplasmine et était négative après neuf minutes.

3. Nous avons enfin cherché à déterminer si la régénération de l'activité enzymatique de la protéine après traitement du sérum par la résine était possible.

A cette fin, en nous basant sur les principes de l'expérience de MORELL et SCHEINBERG (101) rapportée plus haut, nous avons opéré comme il suit :

4 ml d'un sérum de femme enceinte titrant 249 µg % de cuivre total et 50 mg % de céruléoplasmine ont été traités par 1 g de résine selon notre technique.

Les prélèvements des cinq dernières minutes réunis ont été lyophilisés puis redissous dans un tampon acétate pH 5,2 f.i. 1,2 de façon à retrouver un volume de 4 ml égal donc au volume initial.

1 ml d'une solution ascorbique (200 mg % d'acide ascorbique) de CuCl_2 dosée à 1 $\mu\text{g/ml}$ de Cu^{2+} a été rajouté au sérum précédent. Après une incubation d'une demi-heure à 37 °C le taux de céruléoplasmine a été apprécié.

Cette expérience n'a malheureusement pas permis de retrouver l'activité oxydasique initiale, ce qui laisse à penser qu'au pH de fin de réaction très peu différent de 3, la céruléoplasmine est dénaturée. Les auteurs qui nous ont inspiré ont, en effet, réalisé leur expérience sur une solution de céruléoplasmine maintenue à pH 5,2 tant lors de la libération que de la captation du cuivre céruléoplasmique.

TABLEAU XXIII

COMPARAISON DES VARIATIONS DES TAUX DE CUIVRE EN FONCTION DU TEMPS OBSERVEES AU COURS DU TRAITEMENT PAR UNE RESINE AMBERLITE EN PHASE (H) D'UN POOL DE SERUMS DE RATS TEMOINS ET D'UN POOL DE SERUMS DE RATS SURCHARGES EN CUIVRE PAR VOIE ORALE

TEMPS (minutes)	TAUX DE CUIVRE ($\mu\text{g/ml}$)		
	Sérums témoins	Sérums enrichis	« Sérum artificiel »
0	0,133	0,168	0,145
1	0,107	0,130	0,066
2	0,092	0,102	0,014
3	0,088	0,096	0
5	0,070	0,074	0
7	0,053	0,063	0
9	0,050	0,056	0
11	0,050	0,056	0

C) ESSAIS D'APPRECIATION DE LA REPARTITION DU CUIVRE DANS LE SERUM DE RAT APRES SURCHARGE PAR VOIE ORALE.

Bien que les fractions mobilisées successivement soient l'une très semblable à celle constatée avec des solutions d'albumine pure, l'autre corres-

pendant au cuivre céruléoplasmique, nous avons jugé opportun de comparer le comportement d'un sérum normal à celui d'un sérum enrichi en cuivre, *in vivo*, après administration par voie orale d'un sel de cuivre, afin d'observer si la répartition du cuivre assimilé se fait d'une façon prédominante sur telle fraction plutôt que sur telle autre.

Nous nous sommes adressé à deux séries expérimentales de six rats chacune :

- l'une considérée comme témoin ;
- l'autre surchargée *per os* avec 15 mg/kg de cuivre sous forme d'oléate, pendant six jours.

Après traitement, les plasmas de chacun des lots ont fourni les résultats collectés dans le **tableau XXIII**.

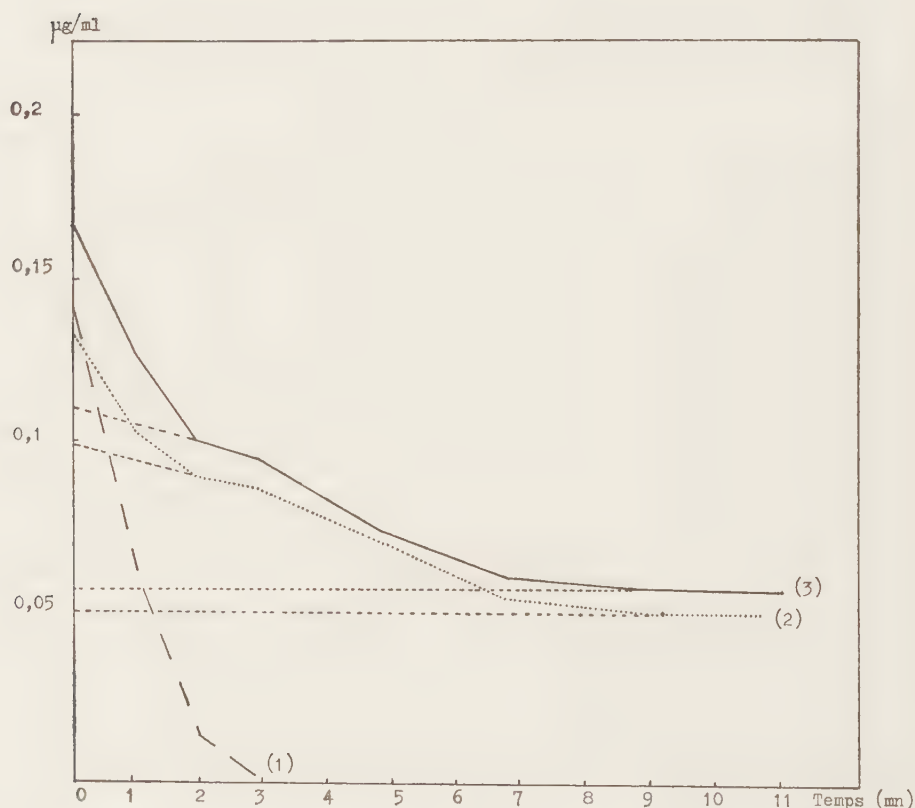


FIG. 20. — COMPARAISON DES COURBES DE MOBILISATION DU CUIVRE PROTÉIQUE ÉTABLIES AVEC UNE SOLUTION SALINE ADDITIONNÉE DE $0,15 \mu\text{g/ml}$ DE Cu^{2+} (1), UN POOL DE SÉRUM DE 5 RATS TÉMOINS DILUÉ AU 1/10 (2) ET UN POOL DE SÉRUMS DE 5 RATS SURCHARGÉS EN CUIVRE PAR VOIE ORALE ÉGALEMENT DILUÉ AU 1/10 (3).

La figure 20, établie à l'aide des résultats précédents, permet de faire deux observations :

- les compartiments du cuivre sérique chez le Rat sont analogues à ceux constatés chez l'homme. On note cependant une répartition quantitative différente dans le sérum normal. En effet, la fraction I représente ici environ 25 % du cuivre total, alors que les fractions II et III en indiquent chacune seulement 37,5 % ;
- la comparaison de ces pourcentages avec ceux observés dans les plasmas surchargés montre ici du moins que la fraction I représente 33 %, les deux autres se partageant également 33,5 % du cuivre total.

Le cuivre exogène, lors de l'assimilation, se fixe donc d'une façon prépondérante sur la fraction I.

D) INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS A PARTIR DU SERUM NORMAL.

En plaçant les résultats précédents dans le contexte de ce travail relatif aux forces de liaisons protéine-cuivre, il est possible de dégager sur les deux compartiments du cuivre mis en évidence les remarques essentielles suivantes :

1° Le « **compartiment albuminique** », le plus faible, est constitué par les complexes les moins stables. A cet égard, les résultats confirment, tant qualitativement que quantitativement, les conclusions de la littérature :

- **qualitativement** : cette fraction correspond au cuivre lié à l'albumine, puisque la pente de décours d'un sérum Wilsonien sans céruléoplasmine ou d'une solution d'albumine humaine surchargée en cuivre, ont la même valeur que celle fournie par un sérum normal.
- **quantitativement** : le pourcentage moyen représenté par cette fraction est très voisin des valeurs déjà décrites.

Au caractère de fragilité relative de la liaison protéine-cuivre dénoncé par l'expérimentation et l'appréciation globale des forces de liaison s'ajoute celui d'une spécificité réduite. En effet, la facilité de formation de telles liaisons aussi bien in vitro qu'in vivo apporte la preuve que le cuivre, à ce stade, n'est pas définitivement intégré dans un compartiment actif, comme le système céruléoplasmique élaboré au cours d'une fonction métabolique hépatique précise.

A notre sens, il s'agit là d'un « **compartiment tampon** » dont la signification est d'assurer un équilibre entre le cuivre assimilé et le cuivre intégré. Cette conclusion, confirmant les résultats de l'expérience de BEARN et KUNKEL (13) montrant la translation progressive in vivo du ^{64}Cu des fractions albuminiques sur les fractions globuliniques, est étayée par nos propres résultats concernant la répartition du métal ingéré. Celle-ci, en effet, se réalise électivement dans le foie d'une part, qui agit autant comme site de stockage que comme organe d'intégration, dans le rein d'autre part qui assure à la fois une élimination accrue et un relais d'attente quand ses possibilités d'élimination sont saturées.

A ce titre, le compartiment albuminique joue un rôle primordial dans le maintien du taux physiologique de cuivre tissulaire. Sa capacité de fixation est, en effet, assez importante pour interdire une répartition anarchique d'un surcroît de métal dans les secteurs où le taux reste normalement cons-

tant. C'est d'ailleurs ce que justifient les résultats obtenus sur des rats surchargés en cuivre ; l'administration pendant six jours d'un sel de cuivre affecte beaucoup plus le compartiment albuminique que les compartiments suivants dont la moindre augmentation dénote d'ailleurs l'apparition de ce que nous appelons le « **cuivre intégré** ».

L'étude suivante montrera, en effet, que dans la plupart des cas où l'élévation de la cuprémie est de règle (laissant à penser qu'elle correspond à une nécessité accrue de l'organisme en cuivre), le compartiment albuminique est beaucoup moins affecté que le compartiment céruléoplasmique.

S'il est possible, à partir des résultats de cette étude, d'attribuer à la fraction labile un « **rôle métabolique tampon** » destiné à amortir les variations de cuivre entre les mécanismes donneurs et les organes d'utilisation, on peut en outre reconnaître au compartiment albuminique, la qualification de « **pool de réserve circulant** » du cuivre. A ce titre, l'albumine représenterait le tout premier compartiment de stockage du métal avant la prise en charge hépatique, la distribution tissulaire et l'élimination.

2° Le « **compartiment céruléoplasmique** » est constitué par au moins deux types de complexes coexistant dans la même molécule ; l'un est complètement dissocié à pH 3, l'autre, stable dans les mêmes conditions, nécessite pour la libération du cuivre une dislocation de la molécule protéique qui ne se trouve pas réalisée dans la méthode décrite.

La répartition à parts égales du cuivre entre les deux fractions reproduit le processus réalisé quand une solution de céruléoplasmine est opposée à une solution d'acide ascorbique. Nous avons vu plus haut que l'activité enzymatique vis-à-vis de ce dernier substrat libère quatre atomes de cuivre sur les huit atomes présents dans la molécule native. Il a été montré de même que cette activité vis-à-vis de la paraphénylène-diamine diminue et s'annule après neuf minutes de contact avec la résine, temps au bout duquel l'asymptote de la deuxième courbe de décroissance est atteinte.

Deux premières conclusions peuvent être alors formulées :

a) La moitié du cuivre céruléoplasmique se trouve sous la forme d'un complexe de moindre stabilité, dissociable sous l'influence d'une diminution encore modérée du pH. Si, à l'état physiologique, la mobilisation du cuivre de cette fraction ne peut être induite par des variations de pH d'une telle amplitude, il est par contre vraisemblable que cette mobilisation survienne quand la céruléoplasmine se comporte comme enzyme.

Si une telle méthode d'étude aboutit in vitro aux mêmes résultats que lors d'un processus métabolique normal, elle autorise à considérer la fraction céruléoplasmique comme une forme importante de transfert du cuivre vers les secteurs d'utilisation. La libération du cuivre serait alors réglée par l'activité oxydasique propre de la protéine induite par un ou plusieurs facteurs tissulaires de nature indéterminée jouant le rôle de substrat. Cette hypothèse se trouvera étayée par l'étude de la répartition du cuivre dans les sérums à cuprémie anormale.

b) La seconde moitié du cuivre céruléoplasmique, constituée par la fraction non dissociable, fait partie intégrante de la protéine, l'apoprotéine elle-même possède encore quatre atomes de cuivre traduisant la « **spécificité moléculaire** », alors que les quatre atomes mobilisables induisent « **la spécificité d'action biochimique** ».

3° Intérêt de la méthode de mobilisation progressive du cuivre sérique.

Il s'agit d'une méthode simple d'exploration du métabolisme du cuivre dans le secteur circulant, intéressante aussi bien sur le plan pratique que sur le plan théorique.

Sur le plan pratique, elle présente des avantages par la rapidité de sa mise en œuvre, la multiplicité des résultats qu'elle fournit, l'aspect satisfaisant des renseignements spécifiques obtenus sur les compartiments métaboliques du cuivre circulant.

La rapidité de la mise en œuvre ressort des données techniques que nous avons énoncées. Son association à la méthode de dosage du métal par absorption atomique, qui la fait bénéficier des qualités de sensibilité et de spécificité de cette dernière, permet en un temps très court de déterminer simultanément le taux de cuivre sérique total et l'importance relative des deux compartiments dont les significations physiologiques sont différentes.

Elle remplace judicieusement la méthode de détermination couplée du cuivre direct et du cuivre indirect. Elle n'exige pas notamment la formation préalable d'un complexe diéthylthiocarbamique de spécificité relative et dont l'extraction nécessite la mise en œuvre d'un solvant organique. En outre, l'évaluation de chacune des deux formes de cuivre se fait directement ; en ce sens, les résultats sont plus satisfaisants que ceux fournis par la méthode colorimétrique avec laquelle le cuivre indirect est obtenu par différence entre le cuivre total extrait après acidification chlorhydrique du sérum et le cuivre direct réagissant avec l'agent complexant sans modification préalable du pH du milieu.

L'intérêt pratique le plus appréciable réside sans doute dans le fait que la somme des deux dernières fractions déterminées par le graphique de décroissance correspond au cuivre céruléoplasmique. Cette observation permet de considérer la méthode comme un moyen de dosage de la céruléoplasmine sérique couplé désormais systématiquement à celui du cuivre total. La méthode ne nécessite la mise en œuvre d'aucun substrat particulier dont on a vu qu'il n'en existe pas jusqu'alors de spécifique. Elle est enfin un gage de la validité des résultats puisque sa détermination est basée sur la somme de deux fractions **égales de cuivre**, conséquence du type de la répartition métallique sur la molécule à doser.

— Sur le plan théorique, cette méthode est applicable à l'étude des variations relatives de chacun des deux principaux compartiments du cuivre biochimique engagé dans des processus dynamiques comme l'assimilation du métal exogène, sa répartition dans les organes de stockage, sa transformation et son utilisation.

Pour mieux juger de l'intérêt de cette technique, nous l'avons appliquée à l'étude de cas physiologiques ou pathologiques connus pour présenter un taux anormal de cuivre sérique.

V. — RELATIONS ENTRE L'HYPERCUPREMIE ET DIVERS PROCESSUS PHYSIO-PATHOLOGIQUES. APPLICATION DE LA METHODE DE MOBILISATION PROGRESSIVE DU CUIVRE PROTEIQUE A L'ETUDE DE QUELQUES SERUMS HUMAINS A CUPREMIE ANORMALE.

Nous avons d'abord été tenté de rechercher une plus large information biologique après les observations dispersées décrites sur les élévations

spontanées du cuivre sérique en pathologie. La constatation personnelle de la fréquence et de l'importance du phénomène en physiologie humaine avec la grossesse, en pathologie avec les affections hépatiques et la maladie rhumatismale, nous a amené ensuite à appliquer la méthodologie précédente pour rechercher des informations interprétables sur la nature des liaisons contractées avec les protéines par un cuivre « actif ».

TABLEAU XXIV
VARIATION DE LA CUPREMIE AU COURS DE LA GROSSESSE

SERUMS	DUREE DE GESTATION EN MOIS	Cu μ g/100 ml	MOYENNES
1 2 3 4	1	209 184 200 235	207,00
5 6 7 8	3	192 244 249 245	232,50
9 10 11 12 13	4	251 248 179 247 227	233,86
14 15 16	6	213 291 255	259,66
17 18 19 20 21 22 23	7	239 261 286 279 238 240 259	258,86
24 25 26 27 28 29	8	261 261 290 297 367 322	299,66

A) RELATIONS ENTRE L'HYPERCUPREMIE ET DIVERS PROCESSUS PHYSIOPATHOLOGIQUES.

1° Cuivre sérique et grossesse.

L'existence de relations entre le processus biologique de la gestation et les variations importantes du taux de cuivre sérique a été reconnue depuis

assez longtemps par plusieurs auteurs. De tous les cations évalués dans le sang maternel, le cuivre est, en effet de loin celui dont l'amplitude des variations est la plus importante. La remarque en a déjà été formulée par WOJCIKA et Coll. (102). Plus récemment O'LEARY et Coll. en 1966 (103) décrivent un parallélisme entre les variations du métal circulant et celles de la fonction oestrogénique placentaire. Les derniers auteurs cités vont d'ailleurs jusqu'à proposer les déterminations de la cuprémie comme test de la fonction placentaire, au même titre que le dosage des oestrogènes sériques et urinaires.

Nous nous sommes également intéressé à une telle observation, car ce processus constitue un rare exemple d'augmentation spontanée du cuivre sérique dans un état physiologique.

L'observation a été faite sur 29 sérums de femmes enceintes (*). La sélection des sujets a été réalisée de façon à déterminer les variations de la cuprémie en fonction du temps à différents stades de la grossesse, puis de choisir le stade correspondant à la plus forte élévation pour étudier les formes sous lesquelles le cuivre se présente dans le sérum.

Le **tableau XXIV** rassemble les résultats obtenus sur les sérums prélevés 1, 3, 4, 6, 7 et 8 mois après la fin des dernières menstruations.

On prend comme valeur normale de la cuprémie la valeur moyenne de 130 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ fournie par la méthode et on observe l'évolution du rapport entre la valeur normale C_0 et les valeurs obtenues aux divers temps C_i .

TABEAU XXV

**VARIATION DU RAPPORT C_i/C_0 DES TAUX DE CUIVRE SERIQUE
COMPARES A L'ELIMINATION DES PHENOLSTEROIDES
(Technique de JAYLE) CHEZ LA FEMME ENCEINTE**

DUREE DE GESTATION (mois)	RAPPORT C_i/C_0	PHENOLSTEROIDES URINAIRES (élimination moyenne en $\mu\text{g}/24\text{ h}$)
1 ^{er} mois	1,59	120
3 ^e mois	1,79	420
4 ^e mois	1,80	2.200
6 ^e mois	1,99	7.400
7 ^e mois	1,98	9.300
8 ^e mois	2,30	10.800

(*) Nous remercions Monsieur le Professeur MORIN, Chef du Service d'Obstétrique de l'Hôpital Lariboisière, à Paris, pour l'accueil et l'aide qu'il nous a réservé.

On voit que cette variation du rapport C/C est assez significative pour qu'on puisse la rapporter au retentissement biochimique de la gestation. Ce lien devient encore plus évident quand on observe l'évolution des tests classiques considérés comme les plus spécifiques, qui consistent à suivre l'élimination urinaire du pregnanediol et surtout celle des phénolstéroïdes. Le **tableau XXV** permet la comparaison des variations de la cuprémie et du taux de phénostéroïdes urinaires.

La relation entre l'élévation physiologique des oestrogènes dans la grossesse et la progression de l'hypercuprémie apparaît évidente. Nous avons nous-même reproduit le phénomène chez l'animal. L'administration par voie sous-cutanée pendant cinq jours de 1 mg de benzoate d'oestradiol à un lot de cinq rattees a permis de mettre en évidence, en fin de traitement, une augmentation de 24 % de la cuprémie comparativement à celle d'un lot témoin. On constate toutefois que, chez la femme en gestation, l'élimination hormonale croît plus vite que le taux de cuivre. Il y a interrelation entre les deux processus, mais cependant pas parallélisme. La mobilisation du métal semble se réaliser presque d'emblée et d'une façon maximale, laissant à penser que l'organisme s'assure une sorte de volant de sécurité en cuivre immédiatement utilisable à moins qu'il n'existe un seuil limite de mobilisation du cuivre tissulaire.

2° Cuivre sérique et affections hépatiques.

L'augmentation de la cuprémie dans les affections hépatiques est un phénomène couramment constaté en clinique, qu'il s'agisse d'hépatite infectieuse, de processus rétentionnels ou cirrhotiques. Peu d'auteurs cependant ont réservé à ce problème une étude critique en dehors de MAHONEY et Coll. (104) qui s'adressent à des animaux de laboratoire chez lesquels a été pratiquée une ligature expérimentale du cholédoque. Plus récemment, LYASHEVA (105) reprend le problème chez l'homme, au cours de l'hépatite épidémique et de son traitement par la thérapeutique anti-inflammatoire. Ce chercheur note une élévation de près de 60 % de la cuprémie par rapport à sa valeur normale. La tendance à la normalisation du taux de cuivre concordant avec la récession du processus pathologique sous l'effet de la corticothérapie laisse logiquement penser à une interrelation des deux phénomènes.

Nous avons nous-même effectué, au cours de bilans hépatiques perturbés, de nombreux dosages du cuivre sanguin. Sur dix cas d'hépatite choisis au hasard, la moyenne trouvée est de 165 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ par rapport à la normale admise de 130 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, soit une augmentation de 21 %. Bien que cette dernière soit très inférieure à la valeur annoncée par LYASHEVA (dont tous les cas rapportés concernent des hépatites infectieuses diagnostiquées) la variation de la cuprémie n'en est pas moins significative.

De façon plus systématique, le phénomène a été reproduit chez le Rat, sur lequel il est aisé de réaliser aussi bien le processus de dégénérescence graisseuse du foie que l'ictère rétentionnel.

La dégénérescence est obtenue expérimentalement en mettant à profit les propriétés toxiques du tétrachlorure de carbone pour le foie. Donc, l'injection de 0,2 ml pour 100 g de poids corporel d'une solution à 10 % de CCl_4 dans l'huile d'olive reproduit l'état pathologique en quelques jours.

Quant à l'ictère rétionnel, il est réalisé par simple ligature du canal cho-
lédoque.

Dans les deux cas, les déterminations des taux de cuivre ont été faites sur le plasma et sur le foie correspondant à cinq rats témoins et à deux lots de cinq animaux soumis l'un au traitement par CCl_4 , l'autre à l'obstruction biliaire. Le **tableau XXVI** permet d'apprécier l'importance des variations observées. Les modifications plasmatiques sont importantes, mais moins toutefois que les variations hépatiques. Dans les deux cas, le foie est affecté mais selon des processus différents.

TABLEAU XXVI

**COMPARAISON DES CONCENTRATIONS DE CUIVRE RENCONTREES
DANS LES PLASMAS ET LES FOIES DE RATS TEMOINS TRAITES AU CCl_4
ET SOUMIS A UNE LIGATURE DU CANAL CHOLEDOQUE**

Nature du traitement	Concentrations plasmatiques (Moyennes : $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	Taux hépatiques (Moyennes : $\text{mg}/100 \text{ g}$ de tissu frais)
Témoins absolus	122	0,49
Cirrhose au CCl_4	146	0,66
Repéré par rétention	222	0,55

La cirrhose lèse le parenchyme hépatique à l'inverse de l'ictère rétionnel qui, tout au moins à ses débuts, laisse intacte l'hépatocyte. S'agit-il dans ces deux types d'atteintes, de formes de cuivre sérique spécifiques affectant des secteurs de transport distincts ? L'importante différence entre les taux hépatiques traduite par une forte augmentation de cuivre dans la cirrhose et une plus faible dans l'ictère par obstruction laisse à penser que, dans le premier cas, il existe une intervention active du foie, alors que, dans le second, le cuivre se trouve maintenu dans une zone voisine de la normale.

Si l'augmentation du taux de cuivre sérique quand le foie est lésé est liée à une activité accrue de synthèse de la céruléoplasmine, l'étude des formes circulantes devrait mettre ce phénomène en évidence. Par contre, l'élévation de la cuprémie dans l'ictère par rétention devrait affecter un compartiment différent.

3° Cuivre et inflammation.

Les modifications plasmatiques du cuivre sérique dans l'état inflammatoire sont connues depuis longtemps.

Dès 1941, HELMEYER et Coll. (106) introduisent cette notion dans le schéma général de la réaction inflammatoire à côté des changements séro-

logiques intéressant les fractions globuliniques. Ils peuvent en outre discerner, parmi les caractéristiques biochimiques générales, celles propres à l'inflammation généralisée ou chronique, et à l'inflammation localisée ou aiguë. Ils observent dans les formes chroniques une augmentation du cuivre sérique modérée accompagnée de variations importantes des γ globulines alors que, dans l'inflammation aiguë l'importante élévation de la cuprémie coïncide avec des modifications correspondant à des α et à des β globulines. Cette dernière constatation nous paraît importante si l'on considère que la céruloplasmine appartient elle-même au groupe des α globulines.

Une publication scandinave, parue en 1966 (107), apporte des constatations intéressantes sur les effets de la gestation sur le pronostic de l'arthrite rhumatoïde. La relation entre les deux états, physiologique et pathologique, est étudiée sur 100 cas de grossesse avec arthrite rhumatoïde comparativement à des rhumatisantes non prégnantes. Les tests sérologiques mis en œuvre sont nettement moins positifs dans le premier groupe que dans le second, laissant penser à une sorte d'effet curatif de la grossesse sur le rhumatisme. Cet effet disparaît dans la majorité des cas après la délivrance, une phase d'aggravation peut alors survenir, posant le problème de l'opportunité de l'avortement thérapeutique.

Certes, la grossesse peut exercer une action inhibitrice sur le mécanisme d'immunisation responsable de la production du facteur rhumatoïde, toutefois, il ne nous paraît pas interdit de penser que l'amélioration soit liée au surplus physiologique du cuivre sérique de la grossesse, la phase d'aggravation rhumatismale intervenant précisément au moment où se produit une chute brutale de la cuprémie.

Cette hypothèse nous paraît renforcée par l'observation clinique fréquente d'une amélioration de l'inflammation chez les sujets atteints d'ictère par rétention où le taux de cuivre circulant est porté à une valeur considérablement plus élevée que la normale.

C'est en se basant sur des considérations identiques que le cuivre a pu être proposé comme adjuvant de la thérapeutique anti-inflammatoire. N'oublions pas que les charlatans eux-mêmes préconisaient, d'une façon empirique, le port d'un bracelet de cuivre. Plus récemment, sur des critères évidemment plus analytiques, le cuivre, sous forme de complexes de haute stabilité, a été utilisé comme anti-inflammatoire, soit seul, soit en association avec les corticoïdes dont il permet de diminuer la posologie ou d'éviter les incidents de sevrage.

On pourrait mettre en doute la spécificité du cuivre comme potentialisateur de l'activité anti-inflammatoire, puisque d'autres métaux, comme l'or, manifestent également une telle propriété. Cette remarque a été mise à profit dans la chrysothérapie, thérapeutique qui a précédé la cuprithérapie dans le traitement antirhumatismal. A propos de cette similitude d'activité pharmacologique, peut-être convient-il de remarquer que les deux éléments, cuivre et or, se situent dans la même colonne de la classification périodique. Nous nous sommes, en outre, demandé si l'or organique agissait, non pas directement, mais en provoquant une augmentation du cuivre circulant. Cette hypothèse semble se vérifier, car, après injection à deux rats de 1,5 mg d'or, sous forme d'une solution d'aurothio-propanol sulfonate de sodium, la moyenne des cuprémies s'élève à 268 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, au lieu de

133 μg chez les témoins. Or, chez les mêmes animaux traités, les taux hépatiques étaient de 0,63 mg/100 g au lieu de 0,53 mg/100 g chez les animaux témoins.

Ainsi, mis à part le cas de l'ictère rétionnel où l'élévation sanguine provient d'un dépassement du volume de distribution hépatique par insuffisance d'élimination biliaire, la grossesse, les hépatites infectieuses ou cirrhotiques, la maladie rhumatismale laissent penser que les variations du cuivre sérique surviennent chaque fois que l'organisme subit un stress.

Ces observations nous ont incité à chercher dans la méthode de mobilisation progressive du cuivre sérique une technique apte à mieux étudier les formes circulantes du cuivre ainsi qu'à approcher une notion qui nous apparaît maintenant fondamentale, celle du cuivre « actif ».

B) APPLICATION DE LA METHODE DE MOBILISATION PROGRESSIVE DU CUIVRE PROTEIQUE A L'ETUDE DE QUELQUES SERUMS HUMAINS A CUPREMIE ANORMALE.

La pratique hospitalière nous a permis l'étude de nombreux sérums à cuprémie anormale, comme ceux qui se rapportent aux observations précédentes.

1° Expérimentation.

— **Sérum de femme enceinte** depuis huit mois et demi à forte teneur en cuivre et en céruléoplasmine.

— **Affections hépatiques.** Quatre types ont été envisagés :

Un « **Ictère rétionnel** » par lithiase cholédocienne confirmée radiologiquement : ictère franc avec bilirubine indirecte sensiblement normale (7 mg $\%$) et biliburine totale élevée (125 mg $\%$).

Une « **Hépatite virale** » récente dont les principaux tests biologiques du bilan hépatique ont justifié le diagnostic clinique, notamment : l'élimination de la bromosulfonephtaléine retardée (après quarante-cinq minutes la quantité éliminée ne représente que 60 % de la dose injectée) ; les transaminases hépatiques = 270 unités (normales jusqu'à 40 unités) ; la bilirubine totale = 83 mg $\%$ dont 44 mg $\%$ de bilirubine indirecte ; le test de GROS égal à 1,6 ml (normale > 2 ml) ; l'électrophorèse sur papier révèle une augmentation nette du groupe des α globulines ; la cuprémie est de 240 $\mu\text{g}/100$ ml.

Après deux mois d'hospitalisation et de traitement, les signes biochimiques sont devenus pratiquement normaux (activité transaminasique abaissée à 11 unités). Cependant, la persistance d'une insuffisance hépatique révélée par l'apparition à l'électrophorèse du sérum d'un bloc $\beta \gamma$ globulines, oriente le diagnostic clinique vers une **évolution sclérogène** de l'affection primitive. Notons que la cuprémie s'est sensiblement normalisée (140 $\mu\text{g}/100$ ml).

Une « **Cirrhose éthylique de LAENNEC** », étudiée à deux stades de son évolution :

Phase clinique de début, caractérisée à l'électrophorèse par un bloc des $\beta \gamma$ globulines, une diminution du taux des albumines et une augmentation des α globulines. Les taux sériques de cuivre et de céruléoplasmine étaient respectivement de 197 μg et de 40 mg/100 ml.

Phase évolutive terminale : le sérum très ictérique dénote 55 mg/l de bilirubine indirecte et un taux de protides totaux très abaissé à 47 g/l affect-

tant essentiellement le compartiment albuminique. Cuprémie et céruléoplasmine sérique sont très diminuées.

— **Lupus érythémateux** (collagénose) :

les signes inflammatoires sont caractéristiques sur le plan biochimique (sérumuco des à 17 mg/100 exprimés en tyrosine) et sérologique (réaction de WAALER ROSE et test au latex positifs).

2° Technique d'étude.

Mobilisation progressive du cuivre protéique réalisée selon la méthode précédemment décrite.

3° Résultats.

a) Les résultats obtenus chez la **femme enceinte** et le malade atteint de **lithiase choledocienne** ont été couplés afin de comparer le type de distribution du cuivre sérique dans les deux cas.

TABLEAU XXVII
REPARTITION COMPAREE DU CUIVRE SERIQUE
CHEZ UNE FEMME ENCEINTE (8 mois 1/2)
ET DANS UNE LITHIASSE CHOLEDOCIENNE

Origine des sérums	Temps (mn)	µg/ml	Fractions (%)			Céruléoplasmine calculée (mg %)	Céruléoplasmine mesurée (mg %)
			1	2	3		
Femme enceinte de 8 mois 1/2	0	0,400	15,6	41	43,4	95,5	80
	1	0,359					
	2	0,335					
	3	0,330					
	5	0,240					
	7	0,170					
	9	0,149					
	11	0,146					
Lithiase choledocienne	0	0,195	32,5	33,2	34,3	38	30
	1	0,152					
	2	0,131					
	3	0,128					
	5	0,093					
	7	0,074					
	9	0,063					
	11	0,063					

Le tableau XXVII et la figure 21 fournissent les éléments principaux de cette comparaison.



FIG. 21. — REPARTITION COMPAREE DU CUIVRE SERIQUE DANS UN ICTERE PAR RETENTION (1) ET CHEZ UNE FEMME ENCEINTE DEPUIS 8 MOIS 1/2 (2).

Dans les deux types de sérums, on observe une augmentation du pourcentage par rapport au cuivre total, représenté par la fraction I, beaucoup plus importante toutefois dans la lithiase biliaire que chez la femme en gestation, malgré une élévation prépondérante du cuivre total dans le premier cas.

Mais si l'étude des pourcentages des différentes fractions est intéressante, celle de l'augmentation du taux de cuivre céruléoplasmique par rap-

port à sa valeur normale est encore plus significative. On constate, en effet, que, dans l'un et l'autre sérums, le taux de cuivre le plus labile est sensiblement identique (environ 0,050 $\mu\text{g/ml}$), la différence portant électivement sur la somme des deux dernières fractions :

- chez la femme enceinte, l'hypercuprémie est d'origine céruléoplasminique ;
- dans l'ictère par obstruction, elle est d'origine albuminique n'affectant que très peu l'autre compartiment.

TABLEAU XXVIII

REPARTITION COMPAREE DU CUIVRE SERIQUE
DANS UNE HEPATITE VIRALE EN PHASE AIGUE PUIS APRES TRAITEMENT
ET EVOLUTION SCLEROGENE DE L'AFFECTION

Origine des sérums	Temps (mn)	$\mu\text{g/ml}$	Fractions (%)			Céruléo- plasmine calculée (mg %)	Céruléo- plasmine (mg %)
			1	2	3		
Hépatite virale phase aiguë	0	0,240	18,5	39,7	41,8	58	50
	1	0,211					
	2	0,192					
	3	0,187					
	5	0,153					
	7	0,124					
	9	0,102					
	11	0,100					
Hépatite virale phase terminale évolution sclérogène	0	0,140	23,5	38,5	38	32	25
	1	0,120					
	2	0,102					
	3	0,100					
	5	0,073					
	7	0,054					
	9	0,53					
	11	0,49					

b) Les résultats obtenus à partir d'un sérum de malade atteint d'hépatite virale ont de même été couplés pour suivre les modifications du métal survenant chez le même malade, de la phase initiale typiquement inflammatoire à la phase terminale où la persistance de l'insuffisance hépatique a dû être imputée à une évolution sclérogène, c'est-à-dire cirrhotique, de l'affection primitive.

Le tableau XXVIII et la figure 22 récapitulent les résultats de ces deux expériences :

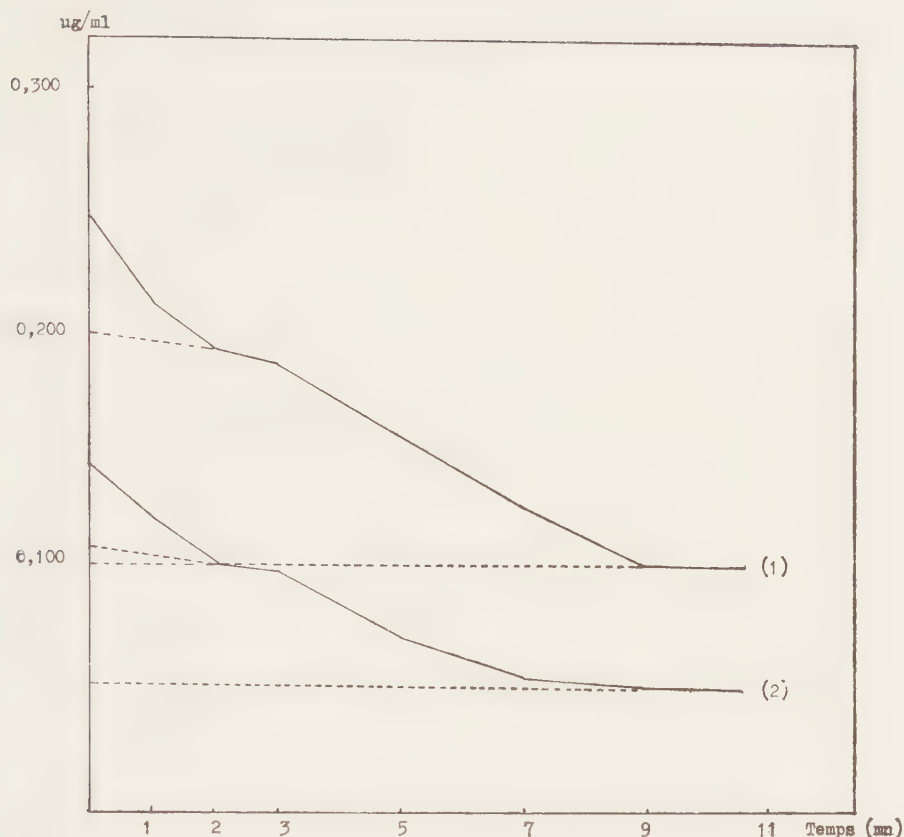


FIG. 22. — REPARTITION COMPAREE DU CUIVRE DANS UN SERUM D'HEPATITE VIRALE DANS SA PHASE INITIALE (1) ET DANS CE MEME SERUM PRELEVE 2 MOIS APRES L'HEPATITE VIRALE AYANT EVOLUE VERS LA CIRRHOSE (2).

Dans les deux cas, la répartition du cuivre sérique s'avère anormale. Cependant, dans la phase aiguë, les modifications des deux compartiments sont sensiblement parallèles, tandis que, dans la phase inflammatoire terminale, à un taux de cuivre total normalisé correspond une fraction labile encore élevée et un compartiment céruléoplasmique en cours d'abaissement.

c) Les résultats obtenus à partir de sérums de deux malades atteints de **cirrhose éthylique**, choisis à deux stades extrêmes de l'évolution de l'affection, présentent les caractéristiques suivantes interprétées à l'aide du **tableau XXIX** et des courbes de la **figure 23**.

TABLEAU XXIX

REPARTITION COMPAREE DU CUIVRE SERIQUE DANS UNE CIRRHOSE DE LAENNEC AVANT ET APRES DECOMPENSATION

Origine des sérums	Temps (mn)	$\mu\text{g/ml}$	Fractions (%)			Céruléo- plasmine calculée (mg %)	Céruléo- plasmine mesurée (mg %)
			1	2	3		
Cirrhose de Laennec (phase initiale)	0	0,197	9,45	44,7	45,85	49	40
	1	0,166					
	2	0,163					
	3	0,160					
	5	0,102					
	7	0,089					
	9	0,083					
	11	0,083					
Cirrhose de Laennec décomposée	0	0,081	30	35	35	19	15
	1	0,062					
	2	0,052					
	3	0,049					
	5	0,35					
	7	0,028					
	9	0,025					
	11	0,026					

Dans la phase initiale du processus, on constate une augmentation significative de la cuprémie sans anomalie apparente de la répartition du métal sur chacune des fractions.

Il n'en est plus de même dans la cirrhose décompensée qui manifeste deux caractéristiques importantes :

- le sujet présente une hypocuprémie franche ;
- la répartition du cuivre est très anormale ; la fraction la plus labile représente presque le tiers du cuivre total et, par voie de conséquence, le cuivre céruléoplasmique est considérablement abaissé.

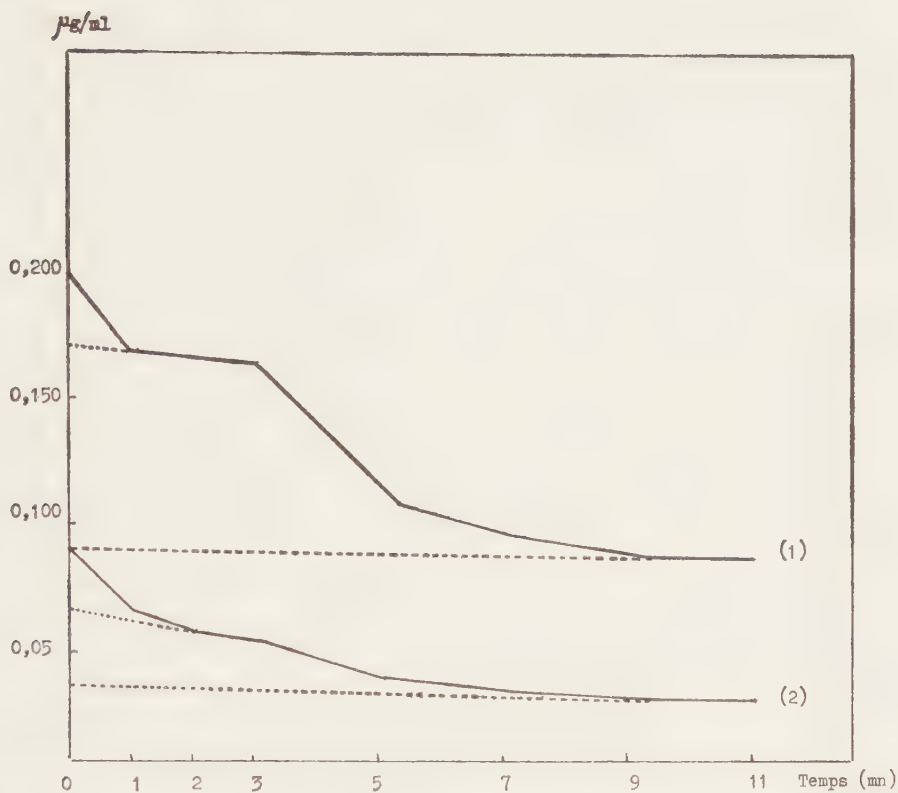


FIG. 23. — REPARTITION COMPAREE DU CUIVRE SERIQUE DANS UNE CIRRHOSE EN PHASE DE DEBUT (1) ET DANS UNE CIRRHOSE DECOMPENSEE (2).

TABLEAU XXX

REPARTITION DU CUIVRE SERIQUE DANS UN CAS DE LUPUS ERYTHEMATEUX

Origine des sérums	Temps (mn)	$\mu\text{g/ml}$	Fractions (%)			Céruléo- plasmine calculée (mg %)	Céruléo- plasmine mesurée (mg %)
			1	2	3		
Lupus érythé- mateux	0	0,196	10,6	44,5	44,9	54	45
	1	0,178					
	2	0,175					
	3	0,175					
	5	0,132					
	7	0,096					
	9	0,080					
	11	0,079					

d) L'étude d'une atteinte du collagène comme le **lupus érythémateux** constitue une illustration du retentissement du processus inflammatoire sur le comportement du cuivre sérique et permet, à l'aide du **tableau XXX** et de la **figure 24**, l'observation suivante : on se trouve ici en présence de résultats comparables à ceux fournis par la cirrhose dans sa phase initiale, traduisant une augmentation significative du cuivre sérique total sans objectiver toutefois d'anomalie apparente dans la répartition du métal. Le rapport Fraction (I)/Fraction (II + III) reste proche de la valeur idéale exprimant ainsi une élévation parallèle de chacune de ces dernières.

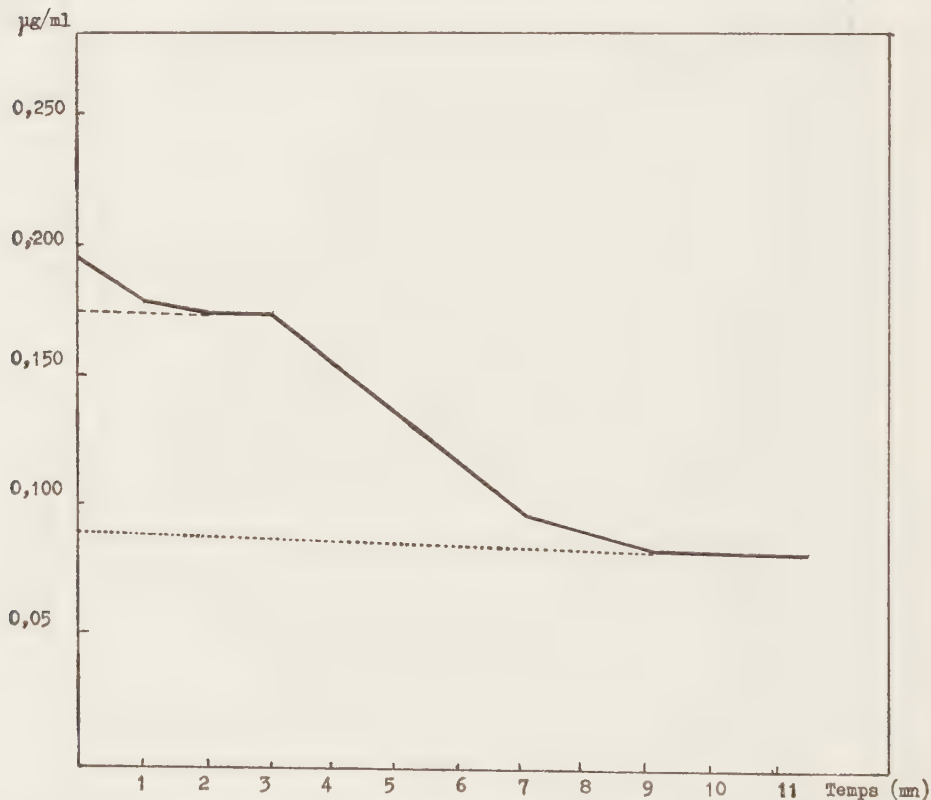


FIG. 24. — REPARTITION DU CUIVRE DANS UN CAS DE MALADIE DU COLLAGÈNE (LUPUS ERYTHEMATEUX).

4° Interprétation des résultats.

Les résultats précédents conduisent à deux séries de remarques : les unes concernent les relations possibles entre la teneur en cuivre total du sérum et le type de distribution du métal dans les deux principaux compartiments mis en évidence, les autres abordent la signification des modifications relevées dans les états physio-pathologiques étudiés.

a) **Relation entre la teneur en cuivre total du sérum et le type de distribution.**

Un sérum peut présenter une **cuprémie** voisine de la valeur **normale** ($130 \pm 15 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ chez l'homme) tout en manifestant une **distribution** du cuivre **anormale**. C'est ce qu'on observe dans l'hépatite à évolution scléro-gène.

Par contre, à une **cuprémie anormale** peut correspondre une **distribution normale** ou proche de la normale. Il en est ainsi dans la collagénose ou la cirrhose à sa phase initiale.

Enfin, une **cuprémie anormale** est souvent accompagnée d'une **distribution anormale**. C'est le cas pour les sérums de femme enceinte et surtout de cirrhose décomposée, d'hépatite virale et d'ictère par obstruction.

Il existe un **rapport caractéristique** entre le cuivre albuminique et le cuivre céruléoplasmique, dans un sérum normal. Ainsi que les courbes de la **figure 15** permettent de le calculer, et en tenant compte des variations physiologiques entre les quatre sérums humains normaux étudiés, ce rapport moyen est de 0,1.

Ce dernier se maintient constant quand les fonctions d'assimilation, de répartition tissulaire et d'élimination restent en équilibre.

Une assimilation accrue de cuivre ainsi qu'une élimination diminuée élèvent la valeur de la fraction la plus labile. Ces conclusions viennent à la suite des résultats obtenus avec des rats surchargés en cuivre par voie orale, et au cours de l'obstruction biliaire caractéristique de la lithiase cholédocienne.

Dans tous les cas où les variations de la cuprémie sont accompagnées de perturbations du rapport comme dans les affections hépatiques de type viral ou cirrhotique où s'installe un processus pathologique tissulaire, la céruléoplasmine sérique supporte les modifications du taux du cuivre total. L'élévation relative de la concentration sérique du métal, manifestée par la fraction labile serait alors la conséquence d'une certaine incapacité fonctionnelle d'élimination.

Dans le sérum de femme enceinte étudié où le cuivre céruléoplasmique atteint en valeur absolue, un taux considérablement plus élevé que celui des autres sérums hypercuprémiques, l'augmentation de la fraction labile est beaucoup moins significative. On est en droit de considérer que la céruléoplasmine, à elle seule, rend compte de l'anomalie constatée sur le cuivre total.

L'augmentation du cuivre albuminique interviendrait seulement pour maintenir normal le rapport entre les deux compartiments.

b) **Essai d'interprétation des deux principaux compartiments du cuivre circulant.**

α **Cuivre albuminique.** Les arguments déjà apportés en faveur de la signification du compartiment albuminique sont renforcés par les remarques précédentes.

Le rôle de l'albumine dans le maintien du taux physiologique de cuivre tissulaire se trouve corroboré par le fait que les valeurs maximales de la

cuprémie anormale apparaissent lors d'une atteinte de la fonction hépatique d'élimination, par insuffisance tissulaire ou obstruction mécanique.

Plus généralement, quand l'anomalie de la cuprémie est imputable à une rupture des équilibres entre les fonctions d'assimilation, de répartition et d'élimination, c'est la fraction labile qui jouerait le rôle d'accepteur du cuivre.

De même l'hypothèse déjà émise du rôle tampon du compartiment albuminique, visant à éviter une surcharge anarchique des autres secteurs, se trouve également étayée.

Enfin, l'élévation caractéristique de la fraction albuminique après surcharge de l'organisme en cuivre exogène ou lors d'une insuffisance d'élimination, explique le troisième rôle de ce compartiment, celui de pool de réserve circulant transitoire.

β Cuivre céruléoplasmique. Les conclusions les plus intéressantes sur les causes de variations du compartiment céruléoplasmique peuvent être classées en deux groupes selon que le rapport cuivre albuminique/cuivre céruléoplasmique reste ou non normal.

Ce rapport ne varie pas d'une façon significative dans trois des exemples étudiés : sérum de femme enceinte au terme de la gestation, sérum de lupus érythémateux, sérum de cirrhose de LAENNEC compensée.

Il est, au contraire, très perturbé dans les trois autres types de sérums : hépatite virale, hépatite virale guérie à évolution sclérogène, et cirrhose éthylique décompensée.

Chez la femme enceinte, l'augmentation du cuivre céruléoplasmique est d'origine hormonale. L'hypercéruléoplasminémie rapportée par STEINBUCH (23), l'hypercuprémie physiologique observée après administration d'oestrogène comme le benzogynœstryl à des rattes et le parallélisme entre les variations du taux du cuivre total et celles de l'élimination urinaire des phénolstéroïdes, constituent autant d'arguments en faveur de cette conclusion.

Il reste à élucider la signification d'un tel phénomène, lequel ne peut être rapporté ici à un processus pathologique. On peut rappeler cependant que les relations entre la maladie rhumatismale et la gestation suggèrent que l'excès de cuivre céruléoplasmique mis en évidence n'est pas étranger à l'amélioration des signes de l'inflammation.

Par contre, dans les affections hépatiques caractérisées par des modifications du taux de céruléoplasmine, le phénomène inflammatoire semble être l'élément responsable.

En effet, les modifications tissulaires de l'hépatite virale et de la cirrhose conduisent, selon des degrés divers, à un processus de dégénérescence scléreuse qui constitue précisément une des principales manifestations de la maladie rhumatismale.

Si, dans tous les cas, l'insuffisance hépatique entraîne des signes de déficience, concernant notamment la fonction d'élimination traduits par l'augmentation constante du rapport des deux compartiments de cuivre, l'hépatite virale se différencie néanmoins du processus cirrhotique. La première, dans sa phase aiguë, est typiquement inflammatoire ; la seconde, quand elle est décomposée signe la gravité, l'irréversibilité de la dégénérescence tissulaire ; les fonctions hépatiques sont très altérées y compris celles de syn-

thèse. Ceci explique la diminution du taux de céruléoplasmine sérique et, par voie de conséquence celle du taux de cuivre total dans l'état cirrhotique avancé.

Le taux élevé de céruléoplasmine dans la cirrhose d'apparition récente, encore bien compensée, indique une relative intégrité des fonctions hépatiques dont celle de synthèse ; l'état inflammatoire provoque le même type de réactions concernant le cuivre que dans le cas du lupus érythémateux. Il faut cependant penser qu'ici le rapport cuivre albuminique/cuivre céruléoplasmique reste normal d'une façon transitoire ; l'évolution de l'affection vers une décompensation progressive permet de placer cet état pathologique comme à l'articulation entre les deux groupes proposés.

L'exemple de l'hépatite virale prolongée par une évolution sclérogène est particulièrement significatif car il permet d'apprécier le passage de l'hépatite virale dans sa forme pure à la cirrhose. La haute teneur en céruléoplasmine et une modification moyenne du rapport des deux fractions caractérise la première ; un rapport très augmenté, un taux de céruléoplasmine en voie d'abaissement dans la seconde, indiquent que la fonction d'élimination est affectée avant la fonction de synthèse.

Enfin, avec la maladie rhumatismale représentée ici par une collagénose, on peut constater que le point commun avec les affections précédentes réside dans l'augmentation prédominante du cuivre céruléoplasmique. On ne retrouve pas ici l'anomalie du rapport des deux fractions. Nous nous garderons cependant de généraliser ces conclusions aux différentes formes du syndrome inflammatoire qui n'a pas fait ici l'objet d'une étude systématique. Notons, en effet, que nos résultats obtenus sur un cas de collagénose ne s'accordent pas avec ceux publiés récemment par LORBER et Coll. (97) pour qui, dans le cas particulier du rhumatisme articulaire, l'élévation de la cuprémie révélerait des variations plus significatives de la fraction du cuivre non céruléoplasmique.

VI. — CONCLUSIONS SUR L'ETUDE DES COMPARTIMENTS DU CUIVRE CIRCULANT.

A) La diminution du rapport cuivre albuminique/cuivre céruléoplasmique n'a pas été observée. Ceci laisse à penser que le cuivre albuminique représente bien le compartiment tampon recherché ainsi que la fraction de réserve du cuivre circulant.

B) Il semble que l'élévation de ce rapport doive être rapportée à deux types de phénomènes :

- 1° Accroissement de l'assimilation du cuivre constaté sur les animaux surchargés par voie orale.
- 2° Diminution de l'élimination biliaire consécutive à l'insuffisance hépatique sous toutes ses formes : obstruction des voies d'excrétion aussi bien que perturbations de la fonction active d'élimination.

C) Le rapport est, par contre, peu modifié quand l'augmentation du cuivre céruléoplasmique est la cause principale de l'hypercuprémie ; les variations positives du cuivre albuminique surviendraient seulement pour maintenir ce rapport proche de sa valeur physiologique.

D) La signification biochimique des variations du cuivre céruléoplasmique découle à la fois de nos observations expérimentales et de l'hypothèse que nous avançons.

Au terme de ce travail, on constate que la céruléoplasmine est augmentée dans deux groupes de processus, sans relations apparentes.

- le premier, physiologique, concernant la grossesse ;
- l'autre, pathologique, qui relèverait de l'inflammation.

En effet, si la cause inflammatoire se trouve justifiée par les expériences réalisées sur des sérums de malades, son application à la grossesse ne peut procéder que de l'hypothèse. Nous avons rapporté plusieurs arguments concernant l'origine hormonale des variations du cuivre sérique, notamment céruléoplasmique. Sans vouloir rapprocher l'état de gestation du phénomène inflammatoire on constate dans les deux cas, un caractère commun, celui des modifications tissulaires. L'augmentation du taux de la céruléoplasmine sérique constituerait une réponse à un certain « stress physiologique » réversible dans le premier cas, à une agression pathologique dans le second, dans la mesure où les réactions peuvent évoluer vers l'irréversibilité.

L'observation d'un parallélisme entre le déclenchement d'un stress dans les affections précitées et l'augmentation de la fraction céruléoplasmique du cuivre sérique, permet de supposer que le deuxième phénomène représente la réponse à une demande accrue de l'organisme. Par suite, la céruléoplasmine représenterait la véritable source de cuivre actif.

Ce n'est pas sans raison que l'activité thérapeutique de l'ion Cu^{2+} a été déjà mise à profit dans le traitement de l'inflammation. Il reste à mieux préciser le rôle curatif des sels de ce métal et l'activité d'anti-inflammatoires majeurs comme la cortisone et ses dérivés.

Dans cet espoir, la mise en œuvre d'une étude analytique systématique d'évaluation simple et rapide du cuivre total et de sa fraction céruléoplasmique, comme de l'importance relative des compartiments décrits, devrait compléter, en pathologie hépatique, l'ensemble des tests biologiques actuels dont l'insuffisance reflète le manque de spécificité.

Les travaux qui sont poursuivis dans le domaine du cuivre en biologie n'ont d'autre prétention que d'aider à élucider un problème encore bien obscur.

CONCLUSIONS GENERALES

A partir d'un ensemble complexe de suggestions déjà émises sur la signification biochimique du cuivre, nous avons tenté de dresser un bilan des acquisitions fondamentales et de poser plus clairement certains des nombreux problèmes encore inexplorés.

Il nous est ainsi apparu qu'aucune étude vraiment systématique ne paraissait avoir encore été réalisée sur l'assimilation, la répartition et l'élimination du cuivre chez l'animal. Cette constatation nous a incité à mettre en œuvre un protocole expérimental, sous forme d'étude cinétique du cuivre dans le sang, dans certains organes comme le foie et le rein ainsi que dans les principaux émonctoires. La localisation et la répartition du cuivre ont pu être ainsi appréciées en fonction des voies d'administration du cation dans l'organisme, de la nature et de la posologie des molécules porteuses administrées.

Des données expérimentales obtenues découlent deux conclusions :

- l'une concerne les règles à suivre pour établir une posologie convenable du cation, avant l'administration de surcharge en cuivre, destinées à définir les conditions limites d'utilisation du métal au cours d'études théoriques et pratiques ;
- l'autre met en lumière les facteurs de régulation du taux physiologique du cuivre, et en évidence une fonction rénale de relai transitoire du cuivre en excès. Elle montre en outre la prédominance de la notion de nature physico-chimique des molécules à cuivre sur l'importance de la dose administrée.

La vitesse d'introduction du cuivre dans l'organisme, traduite par un stockage tissulaire généralement inversement proportionnel au taux d'élimination, nous a conduit à envisager l'existence de « compartiments du cuivre circulant ».

Le choix d'une méthodologie nous a permis d'évaluer l'intensité des forces de liaison des complexes physiologiques du cuivre, qualitativement d'abord à l'aide d'une résine Amberlite en cycle Na, puis quantitativement avec celle d'une résine Amberlite en cycle H. Une technique de mobilisation progressive et de sélection de plusieurs fractions du cuivre protéique a pu être établie, qui a montré l'existence d'au moins deux types de complexes :

- un complexe albuminique, jouant le double rôle de système tampon, destiné à éviter une surcharge anarchique des secteurs tissulaires, et de pool de réserve circulant transitoire, avant la prise en charge hépatique puis l'élimination finale ;

- un complexe céruléoplasmique représenté par deux fractions de cuivre, l'une labile rendant compte de la spécificité d'activité biochimique, l'autre très stable responsable de la spécificité moléculaire.

La technique décrite, d'application facile et rapide, est proposée pour déterminer un « bilan cuivrique » à trois aspects : cuprémie totale, céruléoplasminémie, importance relative des deux compartiments précédents.

Son application à des sérums de cuprémie anormale fournit deux groupes de renseignements :

- les variations du rapport cuivre albuminique/cuivre céruléoplasmique sont en étroite relation avec les fonctions hépatiques d'élimination du cuivre et de synthèse de la céruléoplasmine ;
- la diminution du rapport dans tous les cas où peut être évoqué le processus inflammatoire laisse à penser que le cuivre céruléoplasmique constitue la véritable forme du cuivre actif.

En dehors des résultats immédiats, cette étude présente pour nous l'avantage de servir de banc d'essai à une étude biochimique ultérieure de molécules médicamenteuses actives. La définition des principaux paramètres envisagés : distribution, répartition, élimination, liaisons avec les protéines sériques, doit permettre de préciser l'activité des molécules et la durée de leur action, cette dernière, fonction du temps de passage dans un compartiment déterminé comme de la vitesse de dégradation et d'élimination.

Dans cet esprit le travail réalisé sur le cuivre paraît s'inscrire dans la conception moderne d'investigations biologiques et pharmacocinétiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. JAVILLIER M., Les éléments chimiques et monde vivant, Flammarion Edit.
2. WALSHE J.M., Postgrad. Med. J., 1963, 39, 188.
3. SCOTT C.W., DEMPSEY M.D., Alabama J. Med. Sci., 1966, 3, 1, 10.
4. CARTWRIGHT G.E., HODGES R.E., GUBLER C.J., MAHONEY J.P., DAUM K., WINTROBE M.M., BEAN W.B., J. Clin. Invest., 1954, 33, 1487.
5. CUMINGS J.N., Heavy Metals and the Brain, Oxford Blackwell, 1959.
6. CARTWRIGHT G.E., WINTROBE M.M., Ann. J. Clin. Nutrition, 1964, 14, 224.
7. BRUCKMANN G., ZONDEK S.G., Nature, 1940, 146, 30.
8. AXTRUP S., The blood copper in anemias of children with special reference to premature cases, B.P.H. Lindstedts Univ. Bokhandel Hakan Ohlssons Boktryckeri, Lund, 1946.
9. CHOU T.P., ADOLPH W.H., Biochem. J., 1935, 29, 476.
10. STERNLIEB I., MORREL A.G., TUCKER W.D., GREENE N.W., SCHEINBERG C.H. J. Clin Invest. 1961, 40, 1834.
11. URIEL J., Biol. Med. 1961, (L), 1, 27.
12. KEIDERLING W., Klin. Wehnsehr, 1950, 28, 460.
13. BEARN A.G., KUNKEL H.G., Proc. Soc. Exper. Biol et Med. 1954 b, 85, 44.
14. MARKOWITZ H., GUBLED C.J., MAHONEY J.P., CARTWRIGHT G.E., WINTROBE M.M., J. Clin., Invest. 1955, 34, 1498.
15. STERNLIEB I., MORELL A.G., SCHEINBERG I.H., Tr. A. Ann. Physicians, 1962, 75, 228.
16. HOLMBERG C.G., LAURELL C.B., Acta Chem. Scand. 1951, 5, 921.
17. HOLMBERG C.G., LAURELL C.B., Acta Chem. Scand. 1947, 1, 944.
18. HOLMBERG C.G., LAURELL C.B., Acta Chem. Scand. 1948, 2, 550.
19. HOLMBERG C.G., LAURELL C.B., Acta Chem. Scand. 1951, a, 5, 476.
20. HOLMBERG C.G., LAURELL C.B., Acta Chem. Scand. 1951, b, 3, 103.
21. KASPER B.E., DEUTSH H.F., J. Biol. Chem. 1963, 238, 325.
22. AISEN P., MORELL A.G., J. Biol. Chem. 1965, 240, 1974.
23. STEINBUCH M., Revue d'Hématologie 1958, 13, 3, 387.
24. CURZON G., Nature, 1958, 181, 115.
25. SCHEINBERG J.H., MORELL A.G., J. Clin. Invest. 1957, 36, 1193.
26. HOLMBERG C.G., LAURELL C.B., Scand. J. Clin. a. Lab. invest. 1951, 3, 103.
27. UZMANN L.L., IBER F.L., CHALMERS T.C. Amer. J. Med. Sci. 1956, 231, 511.
28. PORTER H., FOLCK J., Arch. Neurol. Psychiat., 1957, 77, 8.
29. NEUMANN P.Z., SASS KORTSAK A., J. Clin. Inv. 1967, 46 (4) 646.
30. MARTIN R.P., PARIS R.A., C.R. Acad. Sci. (Paris) 1963, 257, 3932.
31. STEIN W.H., MOORE S., J. Biol. Chem. 1954, 211, 915.
32. SARKAR B., KRUCK T.P.A., Biochemistry of Cooper, Eds. New York, Academic Press, 1966, 183.
33. HARRS D.N., SASS KORTSAK A., J. Clin. Inv. 1967, 46, (4) 659.
34. FREEMAN H.C., Biochemistry of Cooper, Eds. New York, Academic Press, 1966, 77.
35. BLUMBERG W.E., Biochemistry of Cooper. Eds. New York, Academic Press, 1966, 49.
36. HEIDELBERGER M., MARPHERSON C.F.C., Sciences, 1943, 97, 405.
37. PORTER H., FOLCH J., J. Neurochem. 1957, 1, 260.
38. PORTER H., SWEENCY M., PORTER E., Arch. Biochem. Biophys, 1964, 105, 319.
39. DIEHL H., SMITH G.F., The copper reagents, G. Frederick Smith Chemical Co, Colombos, OHIO, 1958, 39.

40. PETERSON R., BOLLIER M., *Anal. Chem.* 1955, 27, 1195.
41. MAHLER H.R., *J. Biol. Chem.* 1954, 206, 13.
42. WILLIAMS R.J.P., *Biochemistry of Cooper*, Eds, New York, Academic Press, 1966, 131.
43. KEILIN D., HARTREE E.F., *Nature*, 1938, 141, 870.
44. WAINIO W.W., VAN DER WENDE C., SHIMP N.F., *J. Biol. Chem.* 1959, 234, 2433.
45. TZAGALOFF A., MAC LENNAN D.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 99, 476.
46. VAN GELDER B.F., SLATER E.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 73, 663.
47. VAN GELDER B.F., MUIJSERS A.O., *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 81, 405.
48. SCHULTZE M.O., *Symposium Nutrition Anemia*, 1945, 1, 9, 115.
49. SZENT GYORGII A., *Biochem. J.* 1928, 22, 1387.
50. KOLESNIKOV P.A., EINOR L.O., *Ukr. Botan. Zh.* 1961, 18, 46.
51. VOLK W.A., LARSEN J.L., *Bioch. Biophys. Acta*, 1963, 67, 576.
52. DAWSON C.R., *Biochemistry of Copper*, Eds, New York, Academic Press, 1966, 305.
53. CLARK E.E., POILLON W.W., DAWSON C.R., *Bioch. Biophys. Acta*, 1966, 118, 82.
54. YAMAZAKI I., PIETTE L.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 50, 62.
55. YAMAZAKI I., *J. Biol. Chem.* 1962, 237, 224.
56. LEVINE G.W., *Biochemistry of Copper*, Eds, New York, Academic Press, 1966, 371.
57. KUBOWITZ F., *Biochem. Z.*, 1939, 299, 32.
58. BROOKS W.D., DAWSON C.R., *Biochemistry of Copper*, Eds. New York, Academic Press, 1966, 34.
59. MASON H.S., in « Action mechanism of somme iron and copper protéin oxydases », *Conférence on oxydative métal enzymes*, TOKYO, 1957.
60. NIKODIJEVIE B., CREVELING C.R., UDENFRIEN S., *J. Pharmacol. exptl Therap.*, 1963, 140, 224.
61. GREEN A.L., *Biochim Biophys Acta*, 1964, 81, 394.
62. BRYANT B.E., FERNELIUS W.C., DOUGLAS B.E., *J. Ann. Chem. Soc.*, 1953, 75, 3784.
63. BLUMBERG W.E., GOLDSTEIN M., LAUBER E., PEISACH J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 99, 188.
64. LEVIN E.Y. KAUFMAN S., *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2043.
65. GOLDSTEIN M., *Biochemistry of copper*, Eds. New York, Academic Press, 1966, 450.
66. NARA S., YASUNOBU K.T. *Biochemistry of copper*, Eds. New York, Academic Press, 1966.
67. LONTIE R., WRITTERS R., *Biochemistry of Copper*, Eds. New York, Academic Press, 1966, 455.
68. VANESTE W., MASON H.S., *Biochemistry of Copper*, Eds. New York, Academic Press, 1966, 465.
69. PETERS R.A., *Biochemistry of Copper*, Eds. New York, Academic Press, 1966, 175.
70. WALSH J.M., CUMINGS J.N., « Wilson's disease », *Blakwel Scientific Publications*, OXFORD, 196.
71. WALSH J.M., « Wilson's disease », *Biochemistry of Copper*, Eds. New York, Academic Press, 1966, 475.
72. VAN RAVESTEYN A.H., *Acta Med. Scand.* 1944, 118, 163.
73. SCHUBERT G., RIEZLER W., *Clin Wschr.* 1947, 24, 304.
74. KIRCHGESSNER M., WESER V.Z., *Tierphysiol.* 1965, 20, 261.
75. GUBLER C.J., TAYLOR D.S., EITCHWALD E.J., CARTWRIGHT G.E., WINTROBE M.M., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1954, 86, 223.
76. DICK A.T., BULL L.B., *Soil. Sci.*, 1956, 81, 229.

77. GALLI A., *Ann. Biol. Clin.*, 1968, 26, (7-9), 975.
78. GIRARD M.L., *Clin. Chim. Acta*, 1968, 20, 243.
79. FLEURY P., COURTOIS J.E., *Ann. Pharm. Franc.*, 1945, 3, 14.
80. BERMAN E., *Atomic Absorption Newsletters*, 1964, 3, 11.
81. MALISSA H., SHOEFFMANN E., *Mikrochim. Acta*, 1955, 1, 187.
82. LAKANEN E., *Atomic Absorption Newsletters*, 1966, 5, 17.
83. HERRMANN R., LANG W., *Z. Klin. Chem.*, 1963, 1, 182.
84. TAKENCH T., SUSAKI M., YANAGISAWA M., *Ann. Chim. Acta*, 1966, 36, 258.
85. JEROME H., SCHMITT H., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 36, 1343.
86. BOHUON C., *Ann. Biol. Clin.*, 1958, 13, 73.
87. HERRMANN R., *Z. Ges. Exptl. Med.*, 1955, 126, 334.
88. OWEN C.A., *Ann. J. Physiol.*, 1965, 5, 209, 900.
89. ROUSSELET F., *Thèse Doct. Et. Pharm.*, Paris, 1967.
90. GIRARD M.L., ROUSSELET F., *Ann. Pharm. Franc.*, 1966, (4), 24, 257.
91. ROUSSELET F., GIRARD M.L., *Compt Rend.*, 1965, 260, 3780.
92. GIRARD M.L., ROUSSELET F., *Ann. Pharm. Franc.*
93. PARKER H.E., *Atomic Absorption Newsletters*, 1963, 2, (11), 3.
94. MAHONEY J.P., BUSH J.A., GUBLER C.J., MORETZ W.H., CARTWRIGHT G.E., WINTROBE M.M., *J. Lab. Clin. Med.*, 1955, 46, 702.
95. GABALLAH S., ABOUD L.G., CALEET G.T., KAPSALIS A., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1965, 120, (3), 733.
96. UZMAN L.L., *Ann. J. Med. Sci.*, 1953, 226, 645.
97. LORBER A., CUTLER L.S., CHIA-CHIN-CHANG, *Art. britis and rheumatism*, 11, (1), 1968.
98. VOSKIAN H., ROUSSELET F., GIRARD M.L., à paraître.
99. CHARLOT G., *Analyse qualitative et les réactions en solution*, Edition MASSON, 1963.
100. GOLDSMIT L., *Clin. Chem.*, 1957, 3, 738.
101. MORELL A.G., SCHEINBERG J.H., *Science*, 1958, 127, 588.
102. WOJCIKA J., ZAPALOWSKI Z., *Ginek. Pol.*, 1963, 34, (6), 693.
103. O'LEARY A., *Obstet. Gynecol.*, 1966., 1966, 28 (1), 112.
104. MAHONEY J.P., BUSH J.A., GUBLER C.J., MORETZ W.H., CARTWRIGHT G.F., WINTROBE M.M., *J. Lab. Ann. Clin. Med.*, 1955, 46, 702.
105. LYASHEVA A.P., *Sov. ed.*, 1964, 27 (5), 112.
106. HELMEYER L., KEIDERLING W. STUWE G., in *Kupfer und Eisen, KORPEREIGNE WIRKSTOFFE*, Fischer, JENA, 1941.
107. OKA M., VAINIO U., *Acta Rheum. Scand.*, 1966, 12, 47.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS

PREMIERE PARTIE

ETAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA BIOCHIMIE DU CUIVRE

I. — Aspects physiologiques	18
A) Localisation du cuivre	18
B) Quelques aspects fondamentaux du transport du cuivre....	19
1° Cuivre céruléoplasmique	21
2° Cuivre non céruléoplasmique	23
3° Notions récentes sur les types de liaisons du cuivre et des molécules porteuses de ce métal	25
C) Protéines tissulaires et enzymes à cuivre	27
1° Protéines tissulaires à cuivre	27
2° Enzymes à cuivre	28
a) Cuivre et cytochrome oxydase	29
b) Cuivre et ascorbate oxydase	30
c) Cuivre et polyphénoloxydases	31
d) Conclusions sur l'importance de la fonction enzymatique du cuivre	34
II. — Aspects pathologiques	35

DEUXIEME PARTIE

QUELQUES ASPECTS DU METABOLISME DU CUIVRE CHEZ LE RAT

I. — Connaissances actuelles	37
A) Modalités classiques d'introduction du cation dans l'orga- nisme	37
B) Facteurs influençant l'assimilation digestive du cuivre	38
II. — Possibilités analytiques de dosage du cuivre	39
Choix de la méthode d'absorption atomique	39
A) Spectrophotométrie d'absorption atomique	40
1° Caractéristiques de l'appareillage utilisé	40
2° Préparation des échantillons destinés à l'analyse	41
a) Plasma ou sérum	41
b) Organes	41
c) Urine et matières fécales	42
B) Valeur de la méthode	42
1° Problème des interférences	42
2° Sensibilité	44
3° Reproductibilité des mesures	44
III. — Expérimentation animale	44
A) Principe	44
1° Voie sous-cutanée	44
2° Voie orale	44
3° Voie percutanée	45
B) Justification du choix des organes étudiés	45

C) Prélèvements	46
1° Sang	46
2° Organes	47
3° Urines	47
4° Matières fécales	47
IV. — Assimilation digestive du cuivre chez le rat	47
A) Position des problèmes et justification de l'expérimentation	47
1° Définition d'une posologie du cuivre	48
2° Problème du choix des molécules porteuses de cuivre	48
a) Sels hydrosolubles	48
b) Sels liposolubles	48
B) Analyse des résultats	48
1° Analyse des courbes de concentration plasmatique	48
a) Selon la dose administrée	48
b) Selon la nature des sels de cuivre administrés	51
2° Analyse des variations des taux hépatiques et rénaux	53
a) Selon une même dose administrée à l'aide de deux sels différents	53
b) Selon une même dose administrée à l'aide de quatre sels différents	54
C) Interprétation des résultats	57
1° Conditions de détermination d'une posologie du cuivre par voie digestive	57
2° Influence de la nature de la molécule porteuse de cuivre sur l'absorption digestive	58
3° Contribution à l'étude des facteurs de régulation du taux physiologique du cuivre	60
V. — Comparaison des modes d'introduction du cuivre dans l'organisme	62
A) Voie sous-cutanée	62
1° Variations sanguines	62
2° Variations dans le foie et le rein	62
B) Voie percutanée	63
C) Interprétation des résultats	64
1° Voie parentérale	64
2° Voie percutanée	64
VI. — Elimination urinaire et fécale du cuivre chez le rat après surcharge	65
A) Analyse des résultats	66
1° Elimination urinaire	66
2° Elimination fécale	68
B) Interprétation des résultats. Rôle du rein	70
VII. — Conclusions	70

TROISIEME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES COMPARTIMENTS DU CUIVRE CIRCULANT

I. — Orientation des recherches	73
II. — Méthodologie, utilisation de résine en phase (Na)	74
A) Expérience initiale	74
1° Principe	74

2° Protocole opératoire	75
3° Résultats	76
B) Comportement de quelques complexes du cuivre en présence d'un sérum normal	77
1° Principe	77
2° Résultats et interprétation	79
C) Sensibilité des complexes physiologiques du cuivre sérique aux variations de pH	79
1° Principe	79
2° Mode opératoire	80
3° Résultats et interprétation	80
III. — Méthodologie, mise en œuvre d'une résine en phase (H)	82
A) Principe	82
B) Matériel et méthode	84
C) Valeur de la méthode	86
1° Mise en évidence de la dissociation discontinue des complexes protéiques du cuivre	86
2° Paramètres propres au sérum	89
a) Reproductibilité du phénomène de double décroissance	89
b) Influence de la dilution du sérum sur la dissociation des complexes du cuivre	89
3° Paramètres propres à la résine	91
a) Influence de la concentration en résine	91
b) Influence de la concentration en ion Cu^{2+}	92
4° Conclusions	94
IV. — Application de la méthode à l'étude du cuivre dans le sérum normal	95
A) Application de la méthode de mobilisation du cuivre à un sérum et à des solutions protéiques dépourvus de céruléoplasmine	96
B) Comparaison du taux de céruléoplasmine obtenu par calcul et par évaluation expérimentale	99
C) Essais d'appréciation de la répartition du cuivre dans le sérum de rat après surcharge par voie orale	101
D) Interprétation des résultats obtenus à partir du sérum normal	103
1° Compartiment albuminique	103
2° Compartiment céruléoplasmique	104
3° Intérêt de la méthode de mobilisation progressive du cuivre sérique	105
V. — Relations entre l'hypercuprémie et divers processus physiopathologiques - Application de la méthode à l'étude de quelques sérums humains à cuprémie anormale	105
A) Relations entre l'hypercuprémie et divers processus physiopathologiques	106
1° Cuivre sérique et grossesse	106
2° Cuivre sérique et affections hépatiques	108
3° Cuivre sérique et inflammation	109
B) Application de la méthode à l'étude de quelques sérums humains à cuprémie anormale	111
1° Expérimentation	111
2° Technique d'étude	112
3° Résultats	112
a) Grossesse et lithiase biliaire	112
b) Hépatite virale	114
c) Cirrhose éthylique	115

d) <i>Lupus erythemateux</i>	118
4° <i>Interprétation des résultats</i>	118
a) <i>Relations entre la teneur en cuivre totale du sérum et le type de distribution</i>	119
b) <i>Essai d'interprétation des deux principaux compartiments du cuivre circulant</i>	119
VI. — Conclusion sur l'étude des compartiments du cuivre circulant .	121
CONCLUSIONS GENERALES	
BIBLIOGRAPHIE	129

Vu et Permis d'imprimer
Paris le 14 Novembre 1968
Doyen : P. MALANGEAU

IMPRIMERIE J.A.T.

TYPO - OFFSET

PARIS

